

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Сорокиной Ирины Васильевны на диссертационную работу Гончаровой Натальи Валерьевны «Влияние стимуляции макрофагов на экспериментальную дислипидемию у мышей», представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности

1.5.4 – биохимия

**Актуальность работы.** Атеросклероз является ключевым патогенным фактором многих сердечно-сосудистых, церебро-васкулярных и неинфекционных воспалительных болезней и поэтому находится в центре внимания специалистов в области фармакологии, патофизиологии и клинической медицины. Как известно, основными чертами атеросклероза являются хроническое воспаление сосудистой стенки, связанное с накоплением в ней окисленных липопротеидов, и вызванная этим активация макрофагов. Миграция последних в субэндотелиальное пространство и их дифференцировка в пенистые клетки приводит к развитию атеросклеротической бляшки. В этой связи важно отметить, что первичным звеном атеросклероза считается гиперлипидемия, а одним из главных участников процесса – активированные макрофаги. Исследование взаимоотношений этих двух компонентов патогенеза и разработка на этой основе новых стратегий лечения является одной из приоритетных, но пока еще не вполне решенной проблемой. В свете этого, диссертационная работа Гончаровой Натальи Валерьевны, посвященная экспериментальному исследованию влияния стимуляции макрофагов на индуцированную дислипидемию, является, несомненно, актуальной.

**Степень разработанности проблемы.** В настоящее время золотым стандартом в первичной и вторичной профилактике атеросклероза являются статины. Их действие направлено на подавление одной из ранних стадий синтеза холестерина, что способствует уменьшению ЛПНП и повышению уровня ЛПВП в крови. В то же время, патофизиологический механизм снижения статинами триглицеридов остается недостаточно ясным. Очевидным недостатком статинов являются серьезные побочные эффекты, а также развитие резистентности и, в отдельных случаях, непереносимости этих препаратов. Имеется также несколько классов гиполипидемических препаратов, дополняющих лечение статинами, либо

применяемых самостоятельно (моноклональные антитела эволокумаб, алилокумаб, фибраты, антисмысловые нуклеотиды), нацеленных как на снижение гиперхолестеринемии, так и гиперглицидемии.

В представленной диссертационной работе в качестве гиполипидемических средств предложены полисахариды различных классов: маннан *Candida albicans* серотипов А и В и карбоксиметилированный (1-3)-В-D-гликан. При этом выбор соединений данного класса был сделан Натальей Валерьевной на основе способности полисахаридов активировать макрофаги, повышая их антиатерогенный потенциал, а следовательно, и общую эффективность лечения. Такой подход определил общую методологию работы: с использованием экспериментальной модели дислипидемии у мышей оценить гиполипидемический эффект полисахаридов и определить его связь с индукцией протеинов, экспрессирующихся у активированных макрофагов. В качестве таких маркерных белков Н.В. Гончарова выбрала хитотриозидазу СНТ1 и продукты экспрессии генов хитиназ *Chia1* и *Chit1*, которые, согласно литературным данным, специфичны для активированных макрофагов. Основной экспериментальной моделью являлась модель дислипидемии, индуцированной полноксамером 407. Исходя из цели исследования, автором были поставлены следующие задачи: изучить изменения липидного спектра у мышей, при острой гиперлипидемии, вызванной полноксамером-407; выявить ранние атерогенные изменения на клеточном, биохимическом и морфологическом уровнях при повторном введении полноксамера-407; оценить влияние изучаемых полисахаридов, на гиперлипидемию, индуцированную у мышей и исследовать их влияние на активность хитотриозидазы и экспрессию хитиназ, как маркеров активации макрофагов. Дополнительно ставилась задача сравнить гиполипидемический эффект полисахарида (маннана) со статином (аторвастатином) в рамках выбранной модели. С точки зрения постановки и реализации поставленных соискателем задач структура и объем диссертации представляются адекватными заявленной цели.

**Содержание и оформление диссертационной работы.** Диссертация написана по традиционной схеме, изложена на 139 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, заключения и обсуждения результатов, включает 37 рисунков и 11 таблиц. Библиография насчитывает 310 источников (подавляющее большинство – зарубежных).

**Обзор литературы** изложен на 39 страницах, где даётся общее представление об обмене липидов в организме, гиперлипидемии и атеросклерозе, их терапии. Приведено описание соответствующих экспериментальных моделей. Большое внимание уделено характеристике и биологическим эффектам гликозидов различного строения. Последняя часть обзора посвящена описанию лизосомальных протеинов и их функционированию в клетке, в том числе макрофагальной. В целом обзор даёт достаточно полное представление о рассматриваемых вопросах, логично выстроен, подавляющее число цитируемых работ опубликовано за последние 10 лет.

В главе «**Материалы и методы исследования**» подробно описаны применяемые методы, включая эксперименты *in vitro* и *in vivo*, биохимический анализ липидного профиля сыворотки крови и гомогената органов, а также флуоресцентный анализ ключевых лизосомальных белков и определение экспрессии целевых генов методом ОТ-ПЦР. В работе также применялись методы световой и электронной микроскопии. Выбор методов представляется адекватным поставленным задачам.

**Результаты собственных исследований** изложены на 30 страницах. Приведенные данные показывают, что в условиях острой гиперлипидемии, индуцированной детергентом полоксамером 407, у животных отмечается повышение липидов сыворотки крови, особенно значительное – триглицеридов, которые считаются одним из ведущих факторов развития атеросклероза. На этом фоне автор обнаружила увеличение активности ферментов β-галактозидазы печени

и хитотриозидазы сыворотки крови, что указывает на повышенную лабильность мембран лизосом, а в случае хитотриозидазы – на усиление лизосомной активности макрофагов при гиперлипидемии. У этих же животных при гистологическом исследовании печени отмечено накопление липидов в гепатоцитах и клетках Купфера, а в сердце – повышение активности катепсинов В, L и D в кардиомиоцитах, что может свидетельствовать о нарушениях в их лизосомальном аппарате.

При повторном введении полоксамера 407 наряду с ожидаемым повышением содержания атерогенных липидов в сыворотке крови отмечались и другие нарушения в виде увеличения уровней АЛТ и общего белка, а также повышение артериального давления и сдвиги в массе и клеточном составе селезенки. Эти изменения сопровождались повышением лабильности лизосом печени и снижением их устойчивости к повреждающему гипоосмотическому воздействию. Кроме того, наблюдалось и усиление активности катепсина В в сердце. Интересно, что все наблюдаемые изменения показателей проявлялись через 24 часа, но исчезали через 4-10 дней после окончания хронического воздействия полоксамера. По-видимому, обратимый характер повреждений на фоне месячного воздействия детергента в суммарной дозе 2400 мг/кг свидетельствует скорее о функциональных изменениях в липидном обмене и лизосомном аппарате клеток. Можно ли в этих условиях уверенно утверждать о достигнутых на этом сроке атерогенных изменениях в тканях-мишенях, тем более, что другие показатели (повышение АЛТ, общего белка в крови, систолического и диастолического давления, массы селезенки) скорее свидетельствуют об общетоксическом действии полоксамера. На это, в частности, указывает характер изменений в печени и сердце животных через 24 часа после окончания хронического воздействия детергента. Наряду с явно выраженными признаками гиперлипидемии в виде пенистых клеток, изменений в лизосомном аппарате, – другие структурные изменения (дископлексирование печеночных балок, холестаза, увеличение массы селезенки.

снижение лейкоцитов крови) не носят специфического характера, либо их связь с атерогенезом нуждается в дополнительном экспериментальном обосновании, либо в ссылок на литературу.

Принципиально важные результаты получены Н.В. Гончаровой при изучении эффектов полисахаридов в условиях индуцированной гиперлипидемии. Впервые показано, что предварительное парентеральное введение  $\beta$ -гликана мышам оказывает выраженный гиполипидемический эффект и одновременно нормализует повышенную при острой гиперлипидемии активность хитотриозидазы сыворотки крови. Аналогичный гиполипидемический эффект в сыворотке крови и печени достигался при превентивном введении маннана на фоне полноксамера, при этом он был сравним с эффектом аторвастатина. Наибольшая активность у обоих агентов наблюдалась в отношении ЛПНП и триглицеридов, в отличие от холестерина. Под влиянием маннана и  $\beta$ -гликана в печени мышей с гиперлипидемией отмечено повышение активности макрофагального фермента лизосомной хитотриозидазы и одновременное повышение экспрессии генов хитиназ *Chia1* и *Chit1*, что сопровождалось снижением нагрузки липидами гепатоцитов и Купферовых клеток. Эти данные позволили соискателю сделать вывод о возможности использования хитотриозидазы в качестве маркера увеличения лизосомальной активности стимулированных макрофагов.

Степень достоверности диссертационной работы Н.В. Гончаровой обоснована данными, полученными с использованием современных методов анализа и удовлетворяющим биоэтическим нормам и статистическим критериям. Положения, выносимые на защиту, подтверждаются результатами исследования. Выводы диссертационной работы соответствуют задачам исследования и отражают полученные данные. Материалы работы неоднократно докладывались на российских и международных научно-практических конференциях. По теме диссертационного исследования опубликовано 12 работ в научных рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК.

**Значимость для науки и практики.** В работе представлены новые гиполипидемические агенты из класса полисахаридов, стимулирующих макрофаги. Данные соединения могут представлять интерес для разработки препаратов альтернативных статинам для профилактики и лечения ранних стадий атеросклероза. Выявленные биохимические маркеры активированных макрофагов могут служить диагностическими критериями ранних атерогенных изменений, возникающих при сердечно-сосудистых и церебро-васкулярных патологиях и лизосомальных болезнях накопления. Используемая в работе модель гиперлипидемии, индуцированной поллоксамером 407, может применяться для скрининга новых соединений с гиполипидемическим действием.

Принципиальных замечаний работе не возникло. Тем не менее, хочу отметить неточное, на мой взгляд, название работы, диссоциирующее с формулировкой цели и задач, а также с общей методологией исследования. Более логично было бы назвать исследование: «Влияние полисахаридов на стимуляцию макрофагов при экспериментальной дислипидемии у мышей». Также хотелось бы задать соискателю следующие вопросы:

1). Влияет ли стимуляция макрофагов, как лизосомально ориентированных клеток, на развитие индуцированной дислипидемии, и достаточны ли выявленные биохимические критерии активации макрофагов для оценки анти-атерогенных эффектов новых соединений в рамках данной модели дислипидемии?

2). Принимая во внимание то, что сравнение эффектов маннана и аторвастатина проводилось при разных способах их введения (соответственно при внутрибрюшинном и пероральном), зависит ли гиполипидемический эффект полисахаридов от способа введения в организм?

3). В работе указано, что хитотриозидаза является белком, специфичным для макрофагов, почему автор определял ее в сыворотке крови?

4). Каковы токсические эффекты поллоксамера 407 в организме, в частности, его влияние на почки и иммуностимулирующее действие?

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Гончаровой Натальи Валерьевны «Влияние стимуляции макрофагов на экспериментальную дислипидемию у мышей» является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой. По своей актуальности, методическому уровню, научной новизне, теоретической и практической значимости квалификационная работа соответствует требованиям п.9, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным Положением о порядке присуждения учёных степеней, утверждённых постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013 года № 842, (в редакции Постановления Правительства РФ №1168 от 01.10.2018 г.), а её автор заслуживает учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

### Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник лаборатории  
фармакологических исследований  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Новосибирского института  
органической химии им. Н.Н.Ворожцова  
Сибирского отделения Российской академии наук,  
доктор биологических наук по специальности  
03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология,  
14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология

 Сорокина И.В.

### Адрес учреждения:

630090, г. Новосибирск, проспект  
Лаврентьева, 9, Тел. (383)330 07 3  
e-mail: [sorokina@nioch.nsc.ru](mailto:sorokina@nioch.nsc.ru)  
«31» ноября 202 г.

Подпись Сорокиной И.В. заверяю  
Ученый секретарь НИОХ СО РАН,

 Бредихин Р.А.