

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
Горбатенко Владислава Олеговича
на тему: «Взаимосвязь врожденного иммунитета и энергетического
метаболизма в клеточной модели гипергликемии на первичных
астроцитах»
по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

Диссертационная работа В.О. Горбатенко посвящена комплексному исследованию взаимосвязи энергетического метаболизма и врожденного иммунитета в первичной культуре астроцитов в условиях нормо- и гипергликемии при активации TLR3/TLR4 и пуринергических рецепторов, а также оценке возможности модуляции этих процессов метформином на уровне сигнальных путей, цитокинового ответа и метаболизма оксипиринов. Актуальность темы не вызывает сомнений.

Формирование иммунометаболизма как самостоятельной междисциплинарной области позволило установить тесную взаимосвязь между активацией врожденного иммунитета и перестройкой энергетического обмена клетки. Нарушение этого баланса лежит в основе хронического воспаления, сопровождающего широкий спектр неинфекционных заболеваний, в том числе нейродегенеративные патологии центральной нервной системы.

Гипергликемия, характерная для сахарного диабета и метаболического синдрома, рассматривается сегодня как независимый провоспалительный фактор. Астроциты, являясь наиболее многочисленными глиальными клетками мозга, занимают ключевое положение на пересечении энергетического метаболизма и иммунных реакций: с одной стороны, они – основные потребители глюкозы и обеспечивают метаболическую поддержку нейронов, с другой – экспрессируют функциональный набор толл-подобных рецепторов (TLR), обеспечивающих дифференцированный ответ на бактериальные и вирусные стимулы.

В контексте активного развития клеточной биоинженерии задача рационального проектирования метаболического окружения клеток приобретает особую значимость при создании биоинженерных нейроглиальных систем. Понимание того, как адаптация астроцитов к повышенной концентрации глюкозы модифицирует их TLR- и пуринергически опосредованный ответ и как эти процессы могут быть модулированы метформином, имеет как фундаментальное, так и прикладное значение.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы», раздела «Результаты и их обсуждение», заключения, раздела «Основные результаты и выводы», списка сокращений и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 131 странице машинописного текста, иллюстрирована 21 рисунком и 4 таблицами. Список

литературы включает 233 наименования, что свидетельствует о хорошем знании автором современного состояния исследований в данной области.

Обзор литературы содержит систематизированное изложение современных представлений об иммунометаболизме, сигнальных путях врожденного иммунитета, роли астроцитов в нейровоспалении, метаболизме оксипинов и свойствах метформина. Обзор логично выстроен, хорошо структурирован и служит достаточной теоретической базой для постановки задач.

Раздел «Материалы и методы» детально описывает используемые подходы: получение первичной культуры астроцитов из мозга новорожденных крысят линии Wistar, анализ энергетического метаболизма на анализаторе Seahorse XFp, оценку экспрессии генов методом количественной ОТ-ПЦР, иммуноблоттинг, ИФА и профилирование оксипинов методом UPLC-MS/MS. Используемый арсенал методов адекватен поставленным задачам и соответствует современным мировым стандартам.

В экспериментальной части работы автором впервые охарактеризованы изменения энергетического метаболизма астроцитов при их адаптации к различным концентрациям глюкозы с использованием технологии Seahorse XFp. Показано, что 48-часовая адаптация к гипергликемии (22,5 мМ) приводит к снижению базального гликолиза, увеличению негликолитического закисления и повышению дыхательной емкости митохондрий по сравнению с нормогликемией (5 мМ). Острая стимуляция TLR4 (LPS) и TLR3 (poly(I:C)) не вызывает выраженной перестройки энергетического профиля, что указывает на относительную автономность энергетического ответа от кратковременной активации врожденного иммунитета. Показано влияние метформина на цитокиновый ответ и генерацию АФК. Метформин (2,5 мМ) снижает LPS-индуцированную экспрессию IL-1 β и IL-6 независимо от уровня глюкозы, тогда как его влияние на TNF- α зависит от гликемического статуса. При TLR3-активации метформин подавляет экспрессию TNF- α и IL-6 преимущественно в условиях нормогликемии. Адаптация к гипергликемии усиливает провоспалительный ответ при TLR4-стимуляции, что согласуется с концепцией формирования провоспалительного метаболического контекста. Одной из наиболее интересных частей работы является комплексный анализ профилей оксипинов методом UPLC-MS/MS. Показано, что LPS индуцирует усиление продукции COX-зависимых оксипинов (11-HETE, 6-кето-PGF1 α , PGD2, TXB2, PGE2) с модифицирующим влиянием гипергликемии. Метформин снижает LPS-индуцированный синтез этих оксипинов независимо от адаптации к глюкозе. При PIC-стимуляции выявлен качественно иной профиль с преимущественным вовлечением LOX-зависимых путей и DHA-производных (4-HDoHE). Дифференциальная модуляция профилей оксипинов метформином в зависимости от типа TLR-стимула и концентрации глюкозы представляет собой важный оригинальный результат. Отдельный блок работ посвящен изучению сигнальных механизмов. Показано, что метформин снижает LPS-индуцированное фосфорилирование ERK1/2 и STAT3, а в условиях

гипергликемии также подавляет базальную активность ERK1/2. При PIC-стимуляции метформин повышает активность p38 MAPK и снижает активность STAT3 и ERK1/2. Это свидетельствует о контекст-зависимой модуляции MAPK- и STAT3-зависимых каскадов. Рассмотрена роль внеклеточного АТФ как DAMP-сигнала. Показано, что АТФ не индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов и не активирует NF-κB в астроцитах, однако существенно модулирует профиль оксипинов, усиливая синтез PGD2, TXB2, 12-HHT, 11-HETE, PGA2 по COX-зависимому пути. Автор выдвигает аргументированное предположение, что АТФ-индуцированный профиль может быть связан с фазой разрешения воспаления. Гипергликемия снижает чувствительность астроцитов к АТФ-индуцированному синтезу оксипинов и подавляет активацию cPLA2 и p38 MAPK.

В качестве научной новизны диссертации можно отметить:

- Впервые проведена комплексная оценка энергетического обмена (гликолиза и окислительного фосфорилирования) в первичной культуре астроцитов, адаптированных к гипергликемии, в сочетании с характеристикой их TLR-опосредованного иммунного ответа.
- Впервые продемонстрирован контекст-зависимый характер действия метформина на астроциты, выражающийся в избирательной способности подавлять синтез провоспалительных цитокинов и оксипинов в зависимости от типа TLR-стимула (TLR3/TLR4) и гликемического статуса.
- Впервые проведен полномасштабный анализ профилей оксипинов при стимуляции астроцитов АТФ и показана роль АТФ как специфического модулятора оксипиновых каскадов, потенциально вовлеченных в разрешение воспаления.
- Показана взаимосвязь изменений энергетического метаболизма, сигнальных путей (MAPK, STAT3, NF-κB), цитокинового ответа и профилей оксипинов в условиях нормо- и гипергликемии, что расширяет представления об иммунометаболической регуляции в ЦНС.

Теоретическая значимость работы состоит в углублении представлений о механизмах контекст-зависимого действия метформина в астроцитах и расширении понимания роли оксипинов в регуляции нейровоспаления на фоне метаболических нарушений. Полученные данные вносят существенный вклад в развитие концепции иммунометаболизма ЦНС, демонстрируя, как энергетический статус клетки определяет характер врожденного иммунного ответа.

Практическая значимость заключается в том, что разработанная клеточная модель гипергликемии на первичных астроцитах может рассматриваться как основа биоинженерной платформы для исследования механизмов нейровоспаления и направленного фармакологического воздействия на нейроглиальные клетки. Выявленные закономерности контекст-зависимого действия метформина и оксипиновые профили могут быть использованы для рационального проектирования составов питательных сред и

условий культивирования трехмерных нейроглиальных конструкций, обеспечивающих повышенную выживаемость и функциональную активность астроцитов в моделях дегенеративных и воспалительных процессов.

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием комплекса современных методик, адекватных поставленным задачам, корректным планированием экспериментов, воспроизводимостью данных в независимых биологических повторностях и корректной статистической обработкой.

Основные результаты диссертации опубликованы в трёх статьях в международных рецензируемых журналах, включая Brain Sciences, Cell Biochemistry and Biophysics и Biochemistry (Moscow), а также представлены на пяти конференциях, в том числе международных (FEBS2024, Италия). Автор является первым автором в двух публикаций по теме диссертации, что свидетельствует о его ведущем вкладе в постановку и выполнение экспериментов, анализ и интерпретацию результатов.

Существенных возражений по содержанию работы нет, однако есть некоторые небольшие замечания и комментарии:

ЗАМЕЧАНИЕ 1

На протяжении всей работы автор использует термин «гипергликемия» применительно к клеточным экспериментам *in vitro*. Между тем понятие «гипергликемия» принято использовать для описания патофизиологического состояния организма, тогда как в данном случае точнее говорить о культивировании астроцитов в среде с высокой концентрацией глюкозы (high glucose, HG). В связи с этим возникает и более широкий вопрос: является ли 48-часовая экспозиция астроцитов в среде с 22,5 мМ глюкозы именно адаптацией или же представляет собой острое стрессовое воздействие?

ЗАМЕЧАНИЕ 2

В разделе 2.3 указано, что метформин применяли в течение 24–48 часов, однако на рисунке 3 представлены данные только для 24-часовой точки. Помимо этого, не вполне ясна временная структура протокола: входят ли 24 часа инкубации с метформином в 48-часовой период адаптации к глюкозе или следуют за ним? Дополнительно: в разделе 2.9 При описании методики работы с анализатором Seahorse XFp указана плотность 5000 клеток на лунку, тогда как в разделе 2.2 приведена плотность посева $7,5 \times 10^5$ клеток/лунку в 6-луночные планшеты для основных экспериментов. Желательно более четко описать этапы пересадки клеток в специализированные планшеты Seahorse

ЗАМЕЧАНИЕ 3

На стр. 53 указано, что статистическая обработка проводилась по трём повторностям (лункам) из одного эксперимента. Это неудачная формулировка, или особенность эксперимента? Использование только технических повторностей без включения биологических (независимых культур) ограничивает статистическую надёжность выводов и требует дополнительного обоснования. Отдельно не обоснован выбор различного времени инкубации с

агонистами TLR4 и TLR3 (4 и 6 часов соответственно): не указано, на основании каких критериев — литературных данных или предварительных экспериментов — были выбраны эти временные точки.

ЗАМЕЧАНИЕ 4

На стр. 69 утверждается, что при TLR4-стимуляции метформин оказывает влияние только на IL-1 β , однако на соответствующих графиках присутствуют достоверные изменения также для IL-6. Необходимо либо исправить текст, либо пояснить, почему IL-6 намеренно не включён в это обобщение. Кроме того, при описании снижения АТФ-индуцированного синтеза оксипинов в условиях высокой концентрации глюкозы (PGD2, 12-NHT, TXB2, PGA2, 11-NETE в NG-группе ниже, чем в NG) автор констатирует факт, не предлагая механистического объяснения. Обсуждение возможных молекулярных причин этого феномена (например, изменение активности sPLA2 или доступности субстратов) существенно обогатило бы интерпретацию.

ЗАМЕЧАНИЕ 5

В обсуждении роли АТФ как модулятора воспаления (раздел 3.5) автор делает предположение о возможной связи выявленного профиля оксипинов с фазой разрешения воспаления, однако, чтобы этот вывод был более аргументирован целесообразно в будущем провести дополнительные эксперименты с использованием селективных ингибиторов отдельных путей метаболизма оксипинов (например, ингибиторов COX или LOX).

ЗАМЕЧАНИЕ 6

1. Есть некоторые технические замечания к тексту диссертации: встречается разная аббревиатура сокращений на стр. 8 «..ТЛР-опосредованных..», «..TLR-опосредованный иммунный ответ..», на стр. 53 читаем «..в зависимости от последовательного введения соединений..», но если речь идет о культуре клеток, а не о экспериментах с животными, то корректнее использовать не «введение», а «апликация или добавка соединения», на стр. 68 «..TNF α), но всем модели присуща..» видимо опечатка вместо «модели» надо написать «моделям», отдельные стилистические и синтаксические погрешности (например, фраза на странице 84: «модель адаптации астроцитов к высоким концентрациям глюкозы мы Примененный в работе, он открывает...») и т.д..

Необходимо отметить, что указанные комментарии нисколько не снижают научной ценности представленного исследования.

Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия (по биологическим наукам). В работе продемонстрированы ключевые компетенции клеточной биоинженерии: получение и валидация первичной клеточной культуры, управление метаболическим статусом клеток за счет изменения состава среды, количественная оценка функциональных параметров, разработанная модель гипергликемии предложена как биоинженерная платформа для изучения механизмов фармакологической модуляции нейроглиальных клеток. Представленная диссертационная работа является завершённым

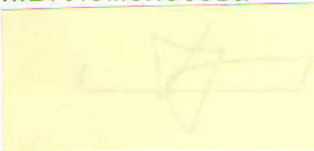
самостоятельным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне с использованием современных подходов клеточной биоинженерии, молекулярной и клеточной биологии. Полученные результаты обладают несомненной научной новизной, теоретической и практической значимостью, а изложенные в диссертации выводы полностью обоснованы.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Горбатенко Владислав Олегович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова



Горбачева Л.Р.

Контактные данные оппонента:

Тел: 8-495-939-14-16, e-mail: gorbi67@mail.ru

05.06.2026

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
03.00.13 – физиология

Адрес места работы: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12,
Биологический факультет МГУ, +7 (495) 939-10-00; e-mail: info@mail.bio.msu.ru

