

**ОТЗЫВ официального оппонента  
на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических  
наук Горбатенко Владислава Олеговича «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 нацелена на всестороннее изучение связи между энергетическим обменом клетки и работой врожденной иммунной системы. Исследование выполнено на первичной культуре астроцитов в условиях нормальной и повышенной концентрации глюкозы, при стимуляции TLR3, TLR4 и пуриnergических рецепторов. Отдельно оценивалась возможность регуляции этих процессов с помощью метформина через сигнальные каскады, продукцию цитокинов и метаболизм оксипинолов. За последние два десятилетия в биомедицине оформилось направление иммунометаболизма, которое изучает двустороннюю связь между клеточным обменом веществ и иммунными функциями. Центральная нервная система особенно интересна в этом контексте, поскольку нейровоспаление служит общим звеном для многих нейродегенеративных заболеваний (болезни Альцгеймера, Паркинсона, рассеянного склероза и т.д.). Астроциты – самая многочисленная популяция глиальных клеток ЦНС. Они выполняют двойную роль: с одной стороны, это основные потребители глюкозы в мозге, поддерживающие нейроны через лактатный челнок; с другой – они экспрессируют полный набор толл-подобных рецепторов (TLR), что позволяет им напрямую участвовать в воспалении. Гипергликемия, ключевой фактор риска при сахарном диабете 2-го типа, сама по себе оказывает провоспалительное действие на астроциты. Однако механизмы, связывающие адаптацию к высокой глюкозе с изменениями TLR-опосредованных воспалительных ответов, остаются практически неизученными. Именно поэтому метформин, препарат первой линии при диабете 2-го типа, привлекает внимание как потенциальный регулятор нейровоспаления. Тем не

менее, комплексного анализа его влияния на дифференциальную активацию TLR3/TLR4 и пуринергических сигнальных путей в астроцитах в условиях гипергликемии до сих пор не проводилось. **Актуальность** диссертации продиктована как фундаментальной важностью изучения нейровоспаления при метаболических нарушениях, так и практической необходимостью в обоснованных клеточных моделях для биоинженерных задач, в частности в создании биоинженерных тканевых конструкций, проектировании условий культивирования нейроглиальных систем и разработке методов направленной фармакологической регуляции клеточного микроокружения в рамках регенеративной медицины.

Диссертация включает введение, обзор литературы (1), раздел «Материалы и методы» (2), раздел «Результаты и их обсуждение» (3), заключение (4), основные выводы и список цитируемой литературы из 233 наименований. Работа изложена на 131 странице машинописного текста, иллюстрирована 21 рисунком и 4 таблицами.

В **обзоре литературы** подробно разобраны современные данные по нескольким направлениям: концепция иммунометаболизма, сигнальные пути воспалительных реакций на клеточном уровне, оксипирины как ключевые липидные медиаторы воспаления, энергетический метаболизм астроцитов, TLR-экспрессия и функции в астроцитах, пуринергическая сигнализация в ЦНС и свойства метформина как модулятора иммунитета и метаболизма. Обзор позволяет чётко выделить нерешённые вопросы в изучаемой области и служит надёжной теоретической базой для формулировки целей и задач. Обзор написан достаточно подробно, но это не мешает его восприятию благодаря хорошей логической организации.

В разделе «**Материалы и методы**» подробно описан дизайн экспериментов на первичной культуре астроцитов. Используемый автором набор аналитических подходов охватывает несколько уровней — от оценки клеточной биоэнергетики до молекулярного профилирования, которое

включает анализ экспрессии генов (ПЦР в реальном времени), уровень белков (иммуноблоттинг, ИФА) и профиль оксипинов (масс-спектрометрия). Такое разнообразие инструментов свидетельствует о продуманной стратегии исследования, а сам комплекс методов полностью соответствует задачам диссертации.

Самый объёмный и содержательный раздел диссертации — глава «**Результаты и их обсуждение**», включающая пять крупных подразделов, каждый из которых последовательно раскрывает отдельный аспект проблемы.

В подразделе 3.1 с использованием анализатора Seahorse XFp автор впервые охарактеризовал изменения энергетического метаболизма астроцитов при адаптации к нормогликемическим (5 мМ) и гипергликемическим (22,5 мМ) условиям. Установлено, что 48-часовая адаптация к высокой концентрации глюкозы приводит к снижению базального гликолиза, увеличению негликолитического закисления и повышению дыхательной ёмкости митохондрий. Метформин (2,5 мМ) индуцирует Варбург-подобный сдвиг энергетического обмена в сторону гликолиза с одновременным подавлением окислительного фосфорилирования. Острая стимуляция TLR4 (LPS) и TLR3 (poly(I:C)) не вызвала значимых изменений параметров OCR и ECAR, что указывает на относительную функциональную разобщённость энергетического и иммунного модулей в астроцитах в данных экспериментальных условиях. Этот результат интересен для биоинженерного конструирования клеточных моделей нейровоспаления, поскольку свидетельствует о том, что модуляция энергетического статуса астроцитов может рассматриваться как независимый инструмент управления воспалительным ответом при создании клеточных платформ.

В подразделе 3.2 исследовано влияние метформина на цитокиновый ответ при TLR-стимуляции. Показано, что гипергликемия усиливает провоспалительный ответ при активации TLR4: наблюдается повышение экспрессии TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6. Метформин снижает LPS-индуцированную

экспрессию IL-1 $\beta$  и секрецию IL-6 независимо от концентрации глюкозы. При TLR3-стимуляции эффекты метформина сложнее: препарат подавляет экспрессию TNF $\alpha$  и секрецию IL-6 только в нормогликемических условиях, что говорит о контекстно-зависимом характере его противовоспалительного действия. Генерация активных форм кислорода (АФК) стимулируется как LPS, так и PIC примерно в 3 раза, метформин на этот показатель не влияет.

Подраздел 3.3 посвящен комплексному анализу профилей оксипинов методом UPLC-MS/MS. Впервые проведён полномасштабный анализ 24 оксипинов и полиненасыщенных жирных кислот во внеклеточной среде астроцитов. LPS индуцирует выраженное усиление продукции COX-зависимых оксипинов, метформин снижает этот эффект независимо от адаптации к глюкозе. При PIC-стимуляции профиль оксипинов качественно иной: выявлено преимущественное вовлечение LOX-зависимых путей и ДНА-производных. Метформин дифференциально модулирует оксипиновые профили в зависимости от типа TLR-стимула и концентрации глюкозы. Этот результат открывает перспективы для биоинженерного управления липидным медиаторным профилем клеточного микроокружения.

В подразделе 3.4 исследованы внутриклеточные сигнальные механизмы. Метформин снижает LPS-индуцированное фосфорилирование ERK1/2 и STAT3, а при PIC-стимуляции повышает активацию p38 MAPK и подавляет STAT3. Полученные данные показывают, что противовоспалительное действие метформина в астроцитах реализуется, по крайней мере частично, через модуляцию MAPK- и STAT3-зависимых сигнальных каскадов, что важно для понимания молекулярных механизмов управления воспалительным фенотипом глиальных клеток.

В подразделе 3.5 исследована роль внеклеточного АТФ как воспалительного стимула. Полученные данные говорят о том, что АТФ (100 мкМ) не индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов и не активирует NF- $\kappa$ B, но модулирует профиль оксипинов, стимулируя синтез

PGD2, TXB2, 12-ННТ, 11-НЕТЕ и PGA2 через СОХ-путь. Автор обоснованно предполагает, что АТФ-индуцированный профиль оксипинов смещён в сторону, способствующую разрешению воспаления, учитывая наличие как провоспалительных (TXB2, 11-НЕТЕ), так и противовоспалительных (PGA2, 12-ННТ) медиаторов. Выявлены синергические эффекты метформина и АТФ в нормогликемических условиях, которые отсутствуют при гипергликемии. В подразделе также представлен анализ 41 липидного соединения, что значительно расширяет масштаб липидного профилирования по сравнению с предыдущими разделами.

**Научная новизна** диссертации обоснована и подтверждается совокупностью полученных результатов. Впервые проведена комплексная оценка состояния энергетического обмена в первичной культуре астроцитов при адаптации к гипергликемии с использованием биоинженерного метода реального мониторинга биоэнергетики клеток. Впервые продемонстрирован контекстно-зависимый характер действия метформина на астроциты: разнонаправленность эффектов в зависимости от гликемического статуса и типа стимула. Впервые проведён полномасштабный анализ профиля оксипинов при стимуляции астроцитов АТФ и показана роль АТФ как потенциального модулятора разрешения воспаления. **Практическая значимость работы** обусловлена расширением представлений о механизмах нейровоспаления при метаболических нарушениях, что открывает перспективы для направленного фармакологического воздействия на нейроглиальные клетки, а также создаёт методологическую основу для дальнейшего развития клеточной модели как биоинженерной платформы.

**Достоверность результатов** обеспечивается применением современного комплекса экспериментальных методов, воспроизводимостью результатов в независимых биологических повторах и корректной статистической обработкой. **Положения, выносимые на защиту**, полностью обоснованы результатами исследования. Личный вклад автора существенный: разработка

дизайна экспериментов, их непосредственное выполнение, обработка и интерпретация данных, подготовка публикаций. Основные результаты опубликованы в 3 статьях в международных рецензируемых изданиях (Brain Sciences, Cell Biochemistry and Biophysics, Biochemistry (Moscow)), в двух из которых Владислав является первым автором.

В целом диссертация представляет собой законченное исследование, но при ознакомлении с материалами работы у меня возникли следующие замечания:

1. **Отсутствие прямого измерения фосфорилирования АМРК.** Ключевой механизм действия метформина, многократно обсуждаемый в диссертации, – активация АМР-активируемой протеинкиназы (АМРК). В разделе «Обсуждение» (подраздел 3.1.5) приведена подробная схема, связывающая ингибирование комплекса I дыхательной цепи с активацией АМРК и последующим усилением гликолиза. Но ни в одном экспериментальном разделе нет данных об уровне фосфорилирования АМРК в изученных условиях. Это создаёт разрыв между механистической моделью в обсуждении и экспериментальными данными. Стоит хотя бы в рамках обсуждения сослаться на опубликованные данные о фосфорилировании АМРК в астроцитах при аналогичных условиях и явно отметить это ограничение.

2. **Оценка маркеров воспалительного ответа преимущественно на уровне мРНК.** Из пяти исследованных маркеров воспаления ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{iNOS}$ ,  $\text{IL-10}$ ) на уровне белка методом ИФА оценивался только  $\text{IL-6}$ . Для остальных приведены данные исключительно по экспрессии генов (qPCR). В ряде случаев наблюдались расхождения между уровнями мРНК и белка: например, для  $\text{IL-6}$  при  $\text{PIS}$ -стимуляции с метформином уровень мРНК повышался, а секреция белка снижалась. Автор справедливо замечает, что высвобождение белка может запаздывать относительно индукции транскрипции. Тем не менее, данные ИФА хотя бы для  $\text{TNF}\alpha$  как ключевого

провоспалительного цитокина существенно усилили бы доказательную базу и позволили бы увереннее судить о биологической значимости наблюдаемых изменений экспрессии.

3. **Мелкие замечания по оформлению.** В тексте диссертации обнаружен ряд стилистических и оформительских недочётов, которые необходимо устранить перед защитой. В разделе «Цели и задачи» допущено дублирование предлога: «как как DAMP-сигнала». В разделе обсуждения (3.1.5) допущен пропуск слова: «независимы от друга» вместо «независимы друг от друга». В разделе 3.3.2 обнаружена содержательная опечатка: «как для NG, так и для NG» — второе обозначение следует заменить на NG. В оформлении подписей к ряду рисунков допущены лишние запятые при обозначении концентраций, а также единичные пропуски пробелов. Все перечисленные погрешности носят технический характер и не затрагивают содержание исследования.

Вместе с тем, указанные замечания не снижают значимости диссертационного исследования. 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:

Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории Биофармакологии, Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Крестинина Ольга Владимировна



подпись

28.05.2026

дата

Контактные данные:

тел.: +7(917)528-94-99, e-mail: ovkres@mail.ru

Специальность по которым официальным оппонентом защищена диссертация: 1.5.2. – Биофизика (биол. науки)

Адрес места работы:

142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, д. 3, стр. 1.  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук  
Тел.: +7 (4967) 33-05-53; e-mail: office@iteb.ru



*Крестининой О. В.*

О-ЗАМ, ЗАВ. ОДОУ  
С Г. БАКАНОВА