

В диссертационный совет по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук 21.2.080.01, созданный на базе ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
163000, г. Архангельск,
пр. Троицкий, д. 51

ОТЗЫВ

официального оппонента Костаревой Анны Александровны, доктора медицинских наук, директора Института молекулярной биологии и генетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации на диссертацию Круглова Сергея Дмитриевича на тему «Роль метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов периферической крови в формировании клеточно-опосредованного иммунного ответа», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.5. Физиология человека и животных

Актуальность темы диссертационного исследования

Метаболическое перепрограммирование лимфоцитов во многом определяет возможность изменения энергетического статуса клеток для быстрой адаптации к меняющимся условиям микроокружения. В настоящее время золотым стандартом изучения кинетики основных метаболических путей наработки АТФ в клетке - окислительного фосфорилирования и гликолиза - является исследование скорости потребления кислорода и закисления в среде культивирования клеток с помощью анализатора внеклеточного потока (SeahorseXF). Однако при использовании данной методики существуют технические сложности с получением монослоя ряда клеточных культур, в частности, лимфоцитов, в измерительном планшете, что

значительно осложняет применение данного метода при исследовании, например, клеток периферической крови, а также неадгезионных культур. Предложенный в диссертационном исследовании С.Д. Круглова способ определения метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов, выделенных из периферической крови, является в данном контексте более универсальным, что позволило установить роль АТФ и регуляторов митохондриального метаболизма и гликолиза (SIRT3 и HIF-1 α) в формировании иммунных реакций физиологически активированных лимфоцитов, что определяет актуальность работы.

Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов, рекомендаций

Полученных в результате исследования результаты обладают научной новизной. Так, в диссертационной работе автором применён принципиально новый подход к оценке иммунного статуса, основанный на определении показателей метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов периферической крови. В работе установлены взаимосвязи между оцениваемой по изменениям внутриклеточных концентраций SIRT3 и HIF-1 α активностью метаболизма, обеспеченностью АТФ лимфоцитов, их содержанием и популяционным составом. Показано, что механизмы реагирования лимфоцитов в ответ на кратковременное общее охлаждение организма зависят от фонового внутриклеточного содержания АТФ.

Обоснованность и достоверность полученных результатов

Достоверность и обоснованность результатов диссертационного исследования обусловлена достаточным для получения достоверных данных количеством исследований, применением адекватных и современных лабораторных методик, соблюдением требований к пробоподготовке биоматериала и проведением измерений, корректным применением методов статистической обработки.

Связь выполненной работы с государственными и научными программами

Диссертационное исследование было выполнено в рамках программ, с номерами государственной регистрации НИОКТР 122011900104-1 и 122011300377-5 на базе лаборатории экологической иммунологии Института физиологии природных адаптаций ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН.

Научно-практическая ценность полученных автором результатов

Полученные в диссертационном исследовании С.Д. Круглова результаты имеют несомненную теоретическую и практическую значимость. Они позволяют значительно расширить имеющиеся представления о влиянии метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов периферической крови на выполнение ими защитных функций и могут быть рекомендованы к использованию в научных учреждениях, занимающихся изучением метаболизма иммунокомпетентных клеток и регуляторных механизмов иммунитета.

Применяемый в работе способ определения метаболической активности лимфоцитов на основании измерения небольшого числа ключевых регуляторных молекул и их соотношения позволяет получить представление о метаболическом профиле клетки. При этом допускается применение как автоматических, так и полуавтоматических иммуноферментных анализаторов, имеющихся в большинстве лабораторий, что может способствовать внедрению данного метода в деятельность учреждений здравоохранения различных уровней.

Результаты диссертационного исследования используются ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России при подготовке учебно-методических и лекционных материалов по дисциплине «Медицинская биохимия: принципы измерительных технологий в биохимии, патохимия, диагностика, биохимия злокачественного роста» (акт внедрения 19.06.2023) и для оценки иммунного статуса пациентов центром профессиональной диагностики ООО «Биолам» (акт внедрения 02.02.2023).

Соответствие паспорту специальности

Диссертационная работа Круглова Сергея Дмитриевича соответствует паспорту научной специальности 1.5.5. Физиология человека и животных (медицинские науки), в частности:

пункту 1 – «изучение закономерностей и механизмов поддержания постоянства внутренней среды организма человека, механизмов функционирования клеток, принципов их системной организации»;

пункту 2 – «анализ молекулярных, биохимических процессов, определяющих динамику и взаимодействие физиологических процессов и функций человека»;

пункту 3 – «исследование закономерностей физиологических процессов и функций отдельных систем (иммунной, обмена веществ и энергии) организма человека»;

пункту 5 – «биохимический и иммунобиологический статус человека и взаимосвязь этих показателей с их функциональной способностью».

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

Результаты исследования доложены на 3 международных конференциях и опубликованы в 7 печатных работах, 5 из которых в журналах, вошедших в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для публикации работ на соискание учёной степени кандидата наук.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно выполнил поиск и анализ научной литературы, разработал дизайн исследования, лично проводил все лабораторные клеточные манипуляции, связанные с подготовкой проб биологического материала и измерением исследуемых показателей, статистически обработал полученные данные, систематизировал и проанализировал результаты, подготовил и оформил рукопись работы. Оригинальность работы, определённая по системе «Антиплагиат», составила 82,69%.

Оценка содержания диссертации

Диссертация состоит из введения, трёх глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и списка сокращений. Текст изложен на 116 листах, иллюстрирован 26 рисунками и 4 таблицами. Список

литературы содержит 250 источников, из которых 27 русскоязычных и 223 зарубежных авторов.

Во введении дано обоснование актуальности выбранной темы, отражена новизна и практическая значимость работы, анализируется степень её разработанности, формулируются цель, задачи и положения, выносимые на защиту.

Глава 1 посвящена обзору современных литературных данных по теме исследования. Значительное внимание уделено влиянию метаболизма на функциональную активность субпопуляций лимфоцитов на разных этапах реализации клеточного иммунного ответа, охарактеризована роль регуляторов основных метаболических путей наработки АТФ: гликолиза (HIF-1 α) и окислительного фосфорилирования (SIRT3).

В главе 2 подробно отражены материалы и методы, общая структура исследования, способы формирования групп, разъяснены основные направления исследования, описаны используемые лабораторные методики и методы статистической обработки результатов, которые позволяют решить поставленные задачи.

Глава 3 разделена на три подглавы. В первой подглаве приводятся данные о влиянии внутриклеточной концентрации АТФ на содержание и популяционный состав лимфоцитов периферической крови. Во второй подглаве анализируется влияние HIF-1 α - и SIRT3-зависимой регуляции метаболизма на показатели пула лимфоцитов. В третьей подглаве описываются результаты исследования по реагированию иммунокомпетентных клеток на кратковременное общее охлаждение организма. Весь материал хорошо структурирован и наглядно иллюстрирован схемами и таблицами, каждая подглава сосредоточена на решении одной из поставленных задач.

В разделе «заключение» автор подводит итоги проведённого исследования, обсуждает полученные данные, сопоставляя их с имеющимися литературными сведениями, делает выводы и даёт практические рекомендации по применению результатов.

Содержание автореферата и научных трудов, опубликованных по теме диссертации, полностью отражает основные аспекты представленного исследования.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе соискателя нет. Имеются погрешности редакционного характера, которые не влияют на общую положительную оценку исследования. В дискуссионном плане считаю необходимым обсудить следующие вопросы:

1. Процесс гибели клетки сопровождается значительными функциональными перестройками, что может послужить причиной искажения измеряемых показателей. Проводилась ли оценка жизнеспособности лимфоцитов в клеточной взвеси перед процедурой лизирования, и если да, то каким методом??

2. Является ли изменение популяционного состава лимфоцитов периферической крови следствием измененной регуляции АТФ в ответ на холодовое воздействие, либо же изменение популяционного состава как таковое само по себе может являться причиной наблюдаемых изменений в уровне АТФ? Что, по Вашему мнению, является первопричиной наблюдаемых изменений?

3. Какие еще факторы метаболической регуляции помимо HIF-1 α /SIRT3 могут являться регуляторами метаболической активности лимфоцитов и почему в исследовании были выбраны именно данные два фактора? Какие параметры митохондриального метаболизма могут определять эффекты данных регуляторных факторов и существуют ли методы их оценки в клетках?

4. Могут ли описываемые изменения метаболизма в лимфоцитах отражаться на профиле органических кислот и их метаболитов? Целесообразно ли в качестве предлагаемого метода оценки метаболизма использовать оценку компонентов цикла трикарбоновых кислот?.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

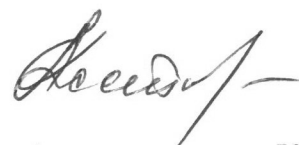
Диссертация Круглова Сергея Дмитриевича «Роль метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов периферической крови в формировании клеточно-опосредованного иммунного ответа», представленная на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.5.

Физиология человека и животных (медицинские науки), по актуальности, научной новизне, методическому уровню, достоверности результатов и обоснованности выводов является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, в которой решена важная научная задача, свидетельствующая о значимости активности метаболизма и обеспеченности энергией лимфоцитов для реализации клеточных механизмов иммунной защиты.

Работа полностью соответствует требованиям п.п. 9, 10 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018, с изменениями от 26.05.2020, 20.03.2021 №426, 11.09.2021 №1539), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а сам диссертант заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.5. Физиология человека и животных (медицинские науки).

Официальный оппонент:

директор Института молекулярной биологии
и генетики ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр имени В. А. Алмазова»
Минздрава России,
доктор медицинских наук



Анна Александровна Костарева

«17» 11 2023 г.

Подпись А.А. Костаревой удостоверяю:



М.П. ДЕЛ. ПЕРСОНАЛА

Данные организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России

Адрес: 197341, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2.

Телефон: 8 (812) 702-37-30.

E-mail: fmrc@almazovcentre.ru.

Официальный сайт: <http://www.almazovcentre.ru>.