

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научно-исследовательской работе
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Петрозаводский государственный
университет» Министерства науки и высшего
образования Российской Федерации



В. С. Сюнев

«30» сентября 2023 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности диссертационной работы Круглова Сергея Дмитриевича на тему «Роль метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов периферической крови в формировании клеточно-опосредованного иммунного ответа», представленной на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.5. Физиология человека и животных (медицинские науки)

Актуальность темы диссертационного исследования

Диссертационная работа С.Д. Круглова «Роль метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов периферической крови в формировании клеточно-опосредованного иммунного ответа» выполнена в рамках современного направления развития иммунологии – иммунометаболизма и посвящена изучению влияния параметров, отражающих метаболическую активность лимфоцитов и обеспеченность их энергией, на клеточный иммунитет. Диссертационное исследование выполнено в федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаврова» Уральского отделения Российской академии наук в лаборатории экологической иммунологии Института физиологии природных адаптаций.

Функциональная активность клеток адаптивной иммунной системы играет решающую роль при формировании защитных реакций организма против патогенов и опухолей. Процессы пролиферации, дифференцировки, синтеза, секреции эффекторных молекул и выживаемость Т-лимфоцитов зависят от активности метаболизма и обеспеченности клеток энергией. Известно, что, как в процессе активации, так и при адаптации к условиям микроокружения происходят динамические метаболические

перестройки, опосредуемые согласованным действием различных регуляторных факторов. Особое значение имеют белки, регулирующие основные пути наработки АТФ – гликолиз (HIF-1 α) и окислительное фосфорилирование (SIRT3).

Метаболические нарушения могут привести к изменениям функциональной активности иммунокомпетентных клеток и последующей анергии, либо избыточной активации, поэтому исследование энергетической обеспеченности и метаболической активности лимфоцитов является актуальным для понимания причин дисфункций в системе адаптивного иммунитета и позволит повысить эффективность диагностики нарушений в работе системы иммунитета.

Связь выполненной работы с государственными и научными программами

Диссертационное исследование было выполнено в соответствии с планом научно-исследовательских работ Института физиологии природных адаптаций ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН на базе лаборатории экологической иммунологии. Номера государственной регистрации НИОКТР: 122011900104-1, 122011300377-5.

Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов, рекомендаций

Автором впервые представлены данные, отражающие зависимость содержания лимфоцитов и их фенотипов в периферической крови от внутриклеточной концентрации АТФ. Результаты проведенного автором статистического анализа показывают, что в группе, где была, статистически значимая, более высокая концентрация АТФ наблюдалось более низкое содержание лимфоцитов и всех определяемых фенотипов, при этом распределение клеток внутри пула характеризовалось повышением удельного веса CD4+, CD8+, CD10+, CD25+ лимфоцитов. В группе, где концентрация АТФ была статически значимо ниже, в популяционном составе преобладали CD23+, CD95+ и HLADR+ клетки, а содержание лимфоцитов и всех измеренных фенотипов наоборот было ниже.

Для оценки метаболической активности лимфоцитов автор использовал способ косвенного установления активности метаболических путей, ответственных за наработку АТФ – гликолиза и окислительного фосфорилирования, через определение внутриклеточного содержания регулирующих их работу белков: HIF-1 α и SIRT3, соответственно. Показано, что внутриклеточная концентрация АТФ, содержание лимфоцитов и их фенотипов зависит как от уровня HIF-1 α и SIRT3, так и от их соотношения. В частности, выявлено, что в группе с более высоким соотношением HIF-1 α /SIRT3 внутриклеточная концентрация АТФ, содержание лимфоцитов и их фенотипов было ниже, чем в группе с более низким соотношением HIF-1 α /SIRT3, при этом в группе с

более высоким соотношением HIF-1 α /SIRT3 внутри популяции преобладали CD4+, CD8+, CD10+, CD25+ лимфоциты.

Автором установлены два варианта реагирования в ответ на кратковременное общее охлаждение организма, обусловленные уровнем энергетической обеспеченности лимфоцитов. Один из вариантов характеризовался следующими статистически значимыми изменениями: снижением содержания CD4+, CD16+, CD25+ лимфоцитов, повышением концентрации IL-6 и TNF- α и падением внутриклеточной концентрации АТФ. Во втором варианте в ответ на холодовое воздействие имело место статистически значимое снижение содержания лимфоцитов и всех определяемых фенотипов, уменьшение концентрации IL-1 β и возрастание внутриклеточной концентрации АТФ.

Обоснованность и достоверность полученных результатов

Достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, доказывается достаточным объёмом исследований, выполненных с использованием современных и адекватных методик анализа. Все цифровые данные подвергнуты статистической обработке с использованием методов сравнительного и корреляционного анализов. Материалы диссертации отражены в автореферате и опубликованы в 7 статьях, из которых 5 статей опубликованы в научных изданиях, индексируемых в международных базах данных Scopus и научных изданиях, включенных ВАК Минобрнауки РФ в перечень изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов диссертаций по медицинским наукам. Выводы диссертации научно обоснованы, соответствуют поставленным задачам, логично вытекают из результатов исследования и отражают все положения, выносимые на защиту.

Таким образом, достоверность полученных С.Д. Кругловым результатов основана на тщательном планировании работы, высоком методическом уровне непосредственного проведения исследования, репрезентативности материала диссертационного исследования, а также адекватном выборе методов статистической обработки результатов с применением современного программного обеспечения.

Научно-практическая ценность полученных автором результатов

подтверждается тем, что в теоретическом плане работа дополняет и расширяет существующие представления о роли метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов в формировании клеточно-опосредованных реакций, что вносит важный вклад в области изучения физиологии иммунокомпетентных клеток.

В практической области полученные результаты могут быть использованы при обследовании иммунного статуса человека. Измерение внутриклеточной концентрации АТФ представляет собой информативный показатель, позволяющий отразить

функциональную активность иммунокомпетентных клеток. Соотношение HIF-1 α /SIRT3 также позволит более полно охарактеризовать состояние иммунной системы, поскольку показывает преобладание либо гликолитической активности, либо митохондриального биогенеза, что в значительной степени влияет на направленность дифференцировки и функционирование лимфоцитов. Таким образом, показатели метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов могут быть использованы для оценки иммунного статуса в крупных мониторинговых исследованиях, диагностике аллергических, аутоиммунных заболеваний и состояний, связанных со сниженной активностью иммунной системы.

Оценка содержания диссертации

Диссертация оформлена согласно требованиям ВАК Минобрнауки РФ и состоит из введения, основной части, содержащей три главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований и их обсуждение), заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, содержащего 250 источников и списка сокращений. Объём диссертации составляет 115 страниц печатного текста. Работа иллюстрирована 4 таблицами и 25 рисунками.

Во введении автором обосновывается актуальность темы исследования. Сформулирована цель и поставлены основные задачи. Обоснована научная новизна, практическая значимость и приведены основные положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы анализируются функции различных субпопуляций, описываются метаболические перестройки, происходящие в процессе активации и дифференцировки лимфоцитов, рассматривается роль метаболических путей и их регуляции в поддержании функциональной активности клеток. Особое внимание уделено SIRT3 и HIF-1 α как основным регуляторам главных путей наработки АТФ – гликолиза и митохондриального метаболизма.

Во второй главе описан обследуемый контингент, определены критерии включения в исследование, подробно рассмотрены используемые методики и приведены статистические методы, применяемые при описании выборок и анализе. Автор использовал достаточный набор современных методов, обеспечивших надёжность полученных результатов. Результаты исследований адекватно обработаны статистически.

В третьей главе приведены основные результаты проведённой работы и их обсуждение. Она разбита на три подглавы, каждая из которых соответствует одной из сформулированных во введении задач.

В подглаве 3.1 приведены данные о влиянии внутриклеточной концентрации АТФ на количественные и качественные показатели популяционного состава лимфоцитов.

Показано, что концентрации и удельный вес исследованных субпопуляций лимфоцитов зависит от внутриклеточного содержания АТФ.

В подглаве 3.2 анализируется влияние основных регуляторов гликолиза и митохондриального метаболизма (HIF-1 α и SIRT3) на популяционный состав лимфоцитов и внутриклеточную концентрацию АТФ.

В подглаве 3.3 отражены результаты исследования влияния кратковременного общего охлаждения организма на уровень энергетической обеспеченности лимфоцитов, их содержание, популяционный состав и функциональную активность, отражающуюся в изменении цитокинового профиля.

В диссертационной работе С.Д. Круглова представлен подробный обзор литературных источников последних лет по теме исследования, задачи соответствуют поставленной цели и способствуют ее решению. Приведено подробное описание использованных методик, достаточное количество результатов для их анализа и представления обоснованных выводов и практических рекомендаций. Три вывода диссертации соответствуют поставленным задачам, четко сформулированы и непосредственно вытекают из собственных данных автора.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.5. Физиология человека и животных (медицинские науки).

По объёму и новизне полученных автором данных и разработанных теоретических положений диссертационная работа Круглова Сергея Дмитриевича на тему «Роль метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов периферической крови в формировании клеточно-опосредованного иммунного ответа» полностью соответствует паспорту научной специальности 1.5.5. Физиология человека и животных (медицинские науки) по областям исследования, в частности:

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

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

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

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

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, из которых – 5 в ведущих рецензируемых журналах, определенных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ.

Результаты диссертации апробированы на заседаниях учёного совета Института физиологии природных адаптаций УрО РАН (Архангельск, 2020-2022), международной конференции «Биомониторинг в Арктике» (Архангельск, 2020), международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы, достижения, инновации» (Пенза, 2020), международной конференции «Сбережение здоровья человека в Арктике» (Архангельск, 2022).

Личный вклад автора

Приведённые в диссертации данные получены при личном участии диссертанта на всех этапах работы. Автором самостоятельно выполнен анализ литературных источников по теме диссертационной работы, определены объём, состав изучаемой выборки, методология исследования, осуществлён сбор материала, его первичная и последующая обработка, проведён статистический анализ полученных результатов, сделаны выводы, даны практические рекомендации.

Результаты диссертационного исследования внедрены

в учебный процесс факультета медико-профилактического дела и медицинской биохимии ФГБОУ ВО «Северный государственный университет» (г. Архангельск) Минздрава России при изучении дисциплин «Медицинская биохимия: принципы измерительных технологий в биохимии, патохимии, диагностике, биохимии злокачественного роста» (акт внедрения от 19.06.2023) и внедрены в работу центра профессиональной диагностики «Биолам» (г. Архангельск), где определение метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов периферической крови используется как информативный показатель при оценке иммунного статуса пациентов (акт внедрения от 02.02.2023).

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Полученные данные могут быть использованы в НИИ и лабораториях, занимающихся изучением метаболизма и механизмов регуляции иммунокомпетентных клеток. Результаты работы могут быть непосредственно использованы в практическом здравоохранении врачами для оценки состояния и способности иммунных клеток к реагированию, что поможет в оценке тяжести состояния, например, при онкологических заболеваниях и иммунодефицитных состояниях. Результаты проведённых исследований могут быть использованы на разных уровнях: в учебном процессе на кафедрах иммунологии, нормальной и патологической физиологии высших медицинских учебных

заведений, биологических и медико-биологических факультетов университетов, в центрах и отделениях клинической иммунологии.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями ВАК Минобрнауки РФ и отражает цель, задачи, методы исследования, основное содержание работы, выводы и практические рекомендации, изложенные в диссертации.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

Принципиальных замечаний по рецензируемой работе не имеется. Присутствуют отдельные стилистические недостатки и технические погрешности, не снижающие качество работы в целом.

В плане дискуссии целесообразно обсудить следующие вопросы:

1. В диссертации недостаточно охарактеризована исследуемая группа: нет основных данных о состоянии здоровья участников исследования (антропометрия, показатели артериального давления и частоты сердечных сокращений в покое). Группа обследованных достаточно большая, поэтому необходима информация о максимальном и минимальном возрасте волонтеров.

2. Не достаточно подробно описаны условия проведения исследований: одежда, контроль теплового состояния испытуемых, реактивность системы кровообращения (артериальное давление и частоты сердечных сокращений). Используемая холодовая экспозиция (5 минут при температуре -25°C) достаточно экстремальная, поэтому требуется контроль функционального состояния испытуемых и обеспечение безопасности.

3. Почему для определения содержания клеток с кластерами дифференцировки в качестве основного выбран метод иммунопероксидазной реакции, а не проточной цитометрии?

4. Известно, что метаболические процессы оказывают значительное влияние на дифференцировку лимфоцитов. Чем может быть обусловлено более высокое содержание клеток с маркером ранней активации CD71 в группе, где наблюдалась более высокая внутриклеточная концентрация активатора митохондриального метаболизма, а не гликолиза?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Круглова Сергея Дмитриевича на тему «Роль метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов периферической крови в формировании клеточно-опосредованного иммунного ответа», выполненная под научным руководством доктора биологических наук, профессора Зубаткиной Ольги Владимировны, является законченной научно-квалификационной

работой, в которой решена актуальная научно-практическая задача в области 1.5.5. Физиология человека и животных (медицинские науки), имеющая существенное значение для физиологии иммунокомпетентных клеток: оценка влияния метаболической активности и сопряжённой с ней обеспеченности клеток энергией на популяционный состав лимфоцитов.

Работа полностью соответствует требованиям п.п. 9, 10 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842 (с изм., утв. 21.04.2016 №335, 20.03.2021 №426, 11.09.2021 №1539), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор, Круглов Сергей Дмитриевич, заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.5. Физиология человека и животных (медицинские науки).

Отзыв на диссертацию С.Д. Круглова «Роль метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов периферической крови в формировании клеточно-опосредованного иммунного ответа» составлен профессором кафедры физиологии человека и животных, патофизиологии, доктором медицинских наук, доцентом Людмилой Ивановной Герасимовой-Мейгал.

Отзыв заслушан, обсуждён и утверждён на совместном заседании кафедр физиологии человека и животных, патофизиологии Медицинского института имени профессора А.П. Зильбера и Института физической культуры, спорта и туризма протокол № 2 от 18 октября 2023 года.

Профессор кафедры физиологии человека
и животных, патофизиологии,
д.м.н., доцент

Людмила Ивановна Герасимова-Мейгал

Подпись руки	<i>Герасимовой-Мейгал</i>
	<i>Людмила Ивановна</i>
УДОСТОВЕРЯЮ.	
Уч. секретарь ученого совета	<i>Девяткина</i>
	<i>«30» октября 2023г.</i>

Сведения об организации:
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Петрозаводский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации Почтовый адрес: 185910, Россия, Республика Карелия, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33
Телефон: 8 (814-2) 71-10-01
Факс: (8814-2) 71-10-00
Адрес сайта: <https://petsu.ru>
Адрес электронной почты: rectorat@petsu.ru