

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
по диссертационной работе СМИРНОВОЙ Ольги Евгеньевны на тему "Роль
некоторых медиаторов и цитокинов тучных клеток и нейронов интрамурального
ганглия в сокращении мышцы трахеи и бронхов крысы", представленной на
соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.5. Физиология человека и животных

Актуальность работы. Физиологии и иммунологии тучных клеток, механизмам нейромастоцитарных взаимодействий обоснованно уделяется все большее внимание в последние годы. По данным PubMed, в последние 5 лет по этой теме ежегодно публикуется около 1700 оригинальных исследований. Столь значительный интерес к этой области возник уже давно, после описания в 1961 г. прямых контактов между нейронами и тучными клетками. Однако в течение многих лет сами тучные клетки оставались одной из самых малоизученных клеточных популяций, функции которых традиционно связывались с участием в реакциях врожденного иммунитета, запуском локального воспаления и аллергических реакций I типа. Даже гистогенез тучных клеток был раскрыт лишь в начале 21 века, а ранее тучные клетки совершенно необоснованно рассматривали как перешедшую к оседлому тканевому существованию форму циркулирующего базофила крови (по аналогии с циркулирующими моноцитами и оседлыми макрофагами). Основной интерес к изучению тучных клеток был связан с их несомненной ролью в аллергических реакциях барьерных структур, прежде всего, кишечной трубки, кожи и органов дыхания. Однако успехи клинико-экспериментальных исследований в целом оказались весьма скромными и свелись к разработке и оценке эффективности стабилизаторов мембран тучных клеток, ингибиторов их активации и антигистаминных препаратов.

Отсутствие прорывных результатов в фармакологической регуляции тучных клеток и новые экспериментальные физиологические результаты, показавшие прямые контакты и двустороннюю сигнализацию между нервными терминалями и тучными клетками (1983 год), обеспечили новый виток в изучении физиологических механизмов их взаимодействия. Результатом стало формулирование совершенно нового подхода к оценке функций тучных клеток как важнейших посредников в нейроэндокринной регуляции физиологических функций, в которых тучные клетки, вероятно, играют важнейшую роль. В настоящее время тучные клетки рассматриваются как и рецепторные, и эффекторные клетки, обеспечивающие передачу афферентного сигнала в вышележащие отделы ЦНС о тканевом повреждении, проникновении антигена или ином локальном отклонении от гомеостаза, и одновременно играющие роль важнейших амплификаторов эфферентных нервных сигналов в конкретном участке.

С этой точки зрения диссертационное исследование О.Е.Смирновой, бесспорно, является актуальным для специальности 1.5.5. Физиология человека и животных, поскольку оно посвящено изучению двусторонней коммуникации тучных клеток трахеи и бронхов и нейронов интрамуральных ганглиев на модели бронхиальной астмы у крыс. Актуальность данного диссертационного исследования определяется как слабой изученностью путей и форм нейромастоцитарной коммуникации в воздухоносных путях, так и наличием слишком большой и сложной классификацией форм бронхиальной астмы, низкой эффективностью ее терапии в целом и тяжелыми системными побочными эффектами при ряде клинических подходов к лечению бронхиальной астмы.

Цель и задачи исследования. Автором работы сформулирована общая цель работы ("выявить роль некоторых медиаторов и цитокинов тучных клеток и нейронов интрамурального ганглия в сокращении мышцы трахеи и бронхов в норме и в условиях модели бронхиальной астмы"), для решения которой выдвинуты 4 конкретные задачи. Задачи 1 и 2 носят в известной степени технический характер, они отражают этапы отработки экспериментальной модели исследования и в известной степени воспроизводят подходы, традиционные для всех экспериментальных работ в этой области физиологии. Задача 1 предусматривает анализ роли медиаторов тучных клеток на примере аденозина, гистамина и серотонина в сократительной способности мышцы, однако ценность результатов по этой задаче связана с параллельным проведением механографии на фоне стимуляции электрическим полем нервных волокон. Задача 2 предусматривает аналогичное изучение эффектов тучноклеточных цитокинов на примере IL-4, IL-6, IL-13, TNF- α также на фоне механографии и стимуляции через нервные волокна. Эти задачи вряд ли можно назвать новыми, скорее, они носят традиционный характер, однако позволяют соотнести уровень экспериментальной работы автора и её мануального мастерства с отечественными и зарубежными аналогами. Тем не менее, параллельное проведение механографии со стимуляцией нервных волокон электрическим полем следует признать оригинальной находкой.

Задача 3, связанная с оценкой изменений экспрессии генов IL-4R, IL-6R, IL-13R, TNF- α R и изменения в экспрессии цитокиновых рецепторов в трахее и бронхах в нормальных физиологических условиях и в условиях овалбумин-индуцированной астмы, является важным этапом исследований как для автора, так и изучения данной проблемы в целом и лишний раз подчеркивает значимость современных молекулярно-биологических подходов для решения актуальных проблем физиологической науки.

Что касается задачи 4, которая представляет собой поиск ответа на вопрос "каким из исследуемых тучно-клеточных или нейрональных медиаторов и цитокинов

принадлежит ведущая роль в сокращении мышцы трахеи и бронхов крысы в норме и в условиях овальбумин-индуцированной астмы", то одна только постановка такого вопроса делает честь автору и показывает, что уровень научной квалификации О.Е.Смирновой и глубина проведенного ею анализа данной проблематики намного превосходят требования, предусмотренные для соискателей ученой степени кандидата наук. Решение этого вопроса может обеспечить полный пересмотр господствующих клинических воззрений и подходов в терапии бронхиальной астмы.

Научная новизна исследования.

Главным научным результатом работы, определяющим её новизну, является доказательство факта, что секреторные продукты тучных клеток играют большую роль в генерации гладкомышечного сокращения и спазма при экспериментальной бронхиальной астме, чем нервная регуляция со стороны вегетативной нервной системы, опосредованная путями, проходящими через интрамуральный ганглий. Также автором установлено, что наиболее эффективно сократительный эффект гладких мышц нижних дыхательных путей обеспечивается TNF- α , который превосходит даже эффект гистамина, судя по результатам механографической оценки. Другим важным результатом работы, который носит приоритетный характер, является доказательство запуска экспрессии генов цитокиновых рецепторов на гладкомышечных клетках нижних дыхательных путей при индукции экспериментальной бронхиальной астмы у животных.

Теоретическое и практическое значение работы.

Работа О.Е.Смирновой вносит существенные дополнения и изменения в представления о запуске и иерархии нервной и гуморальной регуляции при воспалении и механизмах регуляции ответных реакций со стороны органов-мишеней. Доказывается приоритет нервной регуляции сокращения гладких мышц стенок нижних дыхательных путей со стороны вегетативной нервной системы в условиях вне воспаления и, напротив, переход к главенствующей роли гуморальной регуляции после дегрануляции тучных клеток, высвобождения их медиаторов и запуска каскада воспалительных реакций. Эта находка имеет большое теоретическое и практическое значение и очень хорошо объясняет огромную продолжительность спазма гладких мышц при астме и низкую эффективность нейрогенной терапии после запуска воспаления. Более того, именно преобладание гуморальных механизмов регуляции после запуска воспаления способно объяснить длительный характер и распространение патологического процесса от верхних дыхательных путей (где процесс часто начинается с аллергического ринита и полипоза носа) к нижним дыхательным путям (поскольку примерно в 40% случаев отсроченным осложнением полипоза носа является как раз развитие бронхиальной астмы). Поэтому

теоретическое значение результатов, полученных О.Е.Смирновой, не вызывает сомнений. Однако результаты работы при переносе на клиническую практику также способны обеспечить разработку принципиально новых подходов терапии бронхиальной астмы и, что представляется вероятным, любых хронических воспалительных заболеваний органов дыхания и желудочно-кишечного тракта, связанных с дегрануляцией тучных клеток, развитием полипоза и сопутствующего спазма гладких мышц.

Степень обоснованности научных положений и выводов, выносимых на защиту. На защиту выносятся три положения, первое из которых посвящено сопоставлению эффектов гистамина и цитокинов в отношении гладких мышц нижних дыхательных путей. Именно в рамках первого выносимого на защиту положения автор делает важное обобщение: главным продуктом тучных клеток в норме и при экспериментальной бронхиальной астме, оказывающим самые выраженные и клинически значимые эффекты, автор все же считает гистамин. При этом цитокинам отводится главная роль в развитии констрикторного эффекта. Полученный автором массив экспериментальных данных подкрепляет это выносимое на защиту положение, хотя, вероятно, стоит уточнить, что речь идет о сопоставлении эффектов на выделенных препаратах трахеи и бронхов, и в условиях целостного организма выбранные автором цитокины могут иметь не только мастоцитарное происхождение.

Второе выносимое на защиту положение касается усиления экспрессии генов IL-4R, IL-6R, IL-13R, TNF- α R в условиях экспериментальной бронхиальной астмы и дальнейшего усиления экспрессии этих генов при сохранении интрамурального ганглия в препарате трахеи и бронхов. Это положение отлично подкреплено экспериментальными результатами и имеет значительную научную ценность. Если факт усиления экспрессии генов некоторых (например, IL-4) цитокиновых рецепторов при развитии бронхиальной астмы был описан в литературе, то усиление экспрессии этого и других генов при сохранении интрамурального ганглия в препарате открывает новые формы нейроиммунных взаимодействий в тканях в условиях очага воспаления.

Наконец, третье положение, выносимое на защиту, по-видимому, является центральным для работы О.Е.Смирновой, поскольку содержит важнейшую идею о механизмах разграничения нервных и гуморальных влияний в норме и при патологии на примере нижних дыхательных путей. Автор отстаивает мысль, что в норме ведущей является именно нервная регуляция, опосредованная нервными волокнами, связанными с интрамуральным ганглием. В условиях экспериментальной бронхиальной астмы, согласно этому положению, основная индукция мышечной констрикции связана с дегрануляцией

тучных клеток. Базисом этого положения является весь экспериментальный материал работы в целом.

Что касается выводов по работе, которых четыре, то они уточняют три Положения, выносимых на защиту. Результаты, положенные в основу первого положения, представлены в виде выводов 1 и 2, при этом вывод 1 точно соответствует идее первого положения, выносимого на защиту, а вывод 2 отражает результаты о роли TNF α , IL-6 в развитии констрикции. Вывод 3 точно отражает второе Положение на защиту, а в вывод 4 уточняет роль нервной и гуморальной регуляции в развитии констрикции в норме и при экспериментальной бронхиальной астме: влияние нейронов интрамурального ганглия опосредуется мускариновыми холинорецепторами на гладкомышечных клетках.

В целом, можно утверждать, что три положения, выносимые на защиту, и четыре вывода по работе О.Е.Смирновой обоснованы совокупностью приведенных в работе экспериментальных результатов.

Достоверность научных результатов, выводов и научных положений не вызывает никаких сомнений. Она основана на значительном числе экспериментальных животных, адекватных и отработанных методиках работы, использовании автоматизированных объективных методов анализа и объемной статистической обработке. Отражением достоверности результатов является представление и публикация результатов работы в российской и международной научной печати, их обсуждение на научно-практических форумах. Это также повышает уверенность в надежности и достоверности полученных результатов и обоснованности выводов.

Общая характеристика работы.

Работа построена по традиционному плану и включает разделы Введение, Главу 1 (Обзор литературы), Главу 2, посвященную описанию материалов и методов исследования, результаты исследования изложены в Главе 3, а их обсуждение – в Главе 4. Работа завершается изложением 4 выводов, разделом Заключение и обширным списком использованной литературы, включающим 23 работы на русском языке и 385 работ на иностранных языках (всего 408 источников).

Раздел **Введение** не требует расширенного описания, поскольку построен по традиционной схеме.

Обзор литературы (**Глава 1**) представляет собой обширную сводку современной литературы по теме диссертации. Следует отметить очень высокую долю цитируемых и анализируемых публикаций, напечатанных за последние 5 лет. Тем не менее, несмотря на тщательный анализ сводки современной литературы, объем литературного обзора представляется несколько избыточным для любой диссертации (61 страница).

Глава 2 посвящена описанию материалов и методов исследования. Объем этой главы (10 страниц) представляется недостаточным по сравнению с объемом литературного обзора. Вызывает сожаление, что в рамках этой главы в рукописи диссертации и в автореферате указано общее число экспериментальных животных (78 крыс), но не нашлось места для указания числа животных в опытной и контрольной группах. При характеристике экспериментальных животных наблюдается небольшое расхождение между рукописью диссертации и её авторефератом: если в Главе 2 указано, что 3-месячные крысы имели массу тела 350 г, то в автореферате эти же животные имели массу тела уже 500 г. Недостаточное внимание уделено описанию статистических методов, использованных при обработке полученных результатов. Тем не менее, описание основных экспериментальных методов исследования в целом соответствует критерию воспроизводимости.

Изложение собственных результатов приведено в **Главе 3** (65 страниц) и разделено на 4 параграфа. Во всей главе 3 результаты изложены тщательно, корректно, нет смешения описания результатов с их обсуждением. Результаты проиллюстрированы значительным числом таблиц и рисунков, которые снабжены необходимыми комментариями и легендами. Следует отметить хорошее качество микрофотографий, в которых приведены результаты иммуногистохимического исследования. В целом, уровень описания собственных результатов, приведенных в Главе 3, доказывает обоснованность выносимых на защиту положений и выводов по работе.

Глава 4 (11 страниц) посвящена обсуждению полученных результатов. В обсуждении последовательно сопоставляются полученные результаты и литературные данные по разным аспектам работы (оценке роли медиаторов в сокращении мышцы трахеи и бронхов, роли цитокинов в тех же физиологических процессах, и роли нейронов интрамурального ганглия в сокращении мышцы трахеи и бронхов). В целом обсуждение полученных результатов проведено очень точно и корректно.

Выводы и Заключение по работе анализировались выше, хотя в тексте рукописи, скорее всего, их следовало поменять местами.

В рукописи отсутствует список использованных в работе сокращений.

Автореферат отражает содержание работы.

Замечания по работе.

Рукопись диссертации О.Е.Смирновой не свободна от опечаток и стилистических ошибок. По тексту нет единства в написании латинских терминов. Разъяснений со стороны автора требуют использованные концентрации цитокинов. Так, для TNF- α в

рукописи и в автореферате указана рабочая концентрация равная 50 мг/мл, для интерлейкина-6 – 30 нг/мл, для интерлейкина-4 – 150 нг/мл, наконец, для интерлейкина-13 – 100 нг/мл. Следует также уточнить концентрации использованных нейротрансмиттеров, согласно рукописи они составляли для аденозина - 100 мкг/мл, для гистамина - 100 мкг, для серотонина - 100 мкг, двух последних случаях не указан также объем.

Вопросы для дискуссии.

1. Интерлейкин-4, в отличие от TNF- α , IL-6 и IL-13, является короткодистантным цитокином, активным в зоне иммунного синапса, который крайне быстро инактивируется в сыворотке крови в результате связывания с α 2-макроглобулином. Какой механизм констрикторного влияния этого цитокина на гладкомышечные клетки предполагает автор на основании собственных полученных результатов и литературных данных ?

2. При бронхиальной астме период бронхоспазма может длиться очень долго. На основании полученных результатов, как автор может объяснить длительность бронхоконстрикции при бронхиальной астме ?

3. По данным автора, при экспериментальной бронхиальной астме TNF- α обеспечивал самый сильный констрикторный эффект из всех тучноклеточных цитокинов. Однако мощными ингибиторами продукции всех провоспалительных цитокинов являются салицилаты. Почему аспирин, снижающий синтез TNF- α , не снимает бронхоспазм при астме, а в случае формирования аспириновой триады сам запускает его ?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационное исследование СМИРНОВОЙ Ольги Евгеньевны на тему "Роль некоторых медиаторов и цитокинов тучных клеток и нейронов интрамурального ганглия в сокращении мышцы трахеи и бронхов крысы" является законченной научно-квалификационной работой, в которой автор на основании самостоятельно проведенных экспериментов получила новые данные о роли дегрануляции тучных клеток и нейронов интрамурального ганглия в развитии констрикции нижних дыхательных путей при экспериментальной бронхиальной астме и вне её. Результаты важны для общей и клинической физиологии, аллергологии и пульмонологии и вносят существенные дополнения в схему патогенеза социально значимого заболевания. По актуальности темы, методическому уровню, объему и новизне результатов и степени достоверности сделанных выводов работа соответствует требованиям к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, установленным в пп. 9 – 14 "Положения о присуждении

ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями от 26.05.2020 г. и от 20.03.2021), а ее автор О.Е.Смирнова заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. Физиология человека и животных.

Официальный оппонент
заведующий отделом иммунологии
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения "Институт экспериментальной
медицины",
доктор биологических наук профессор



Полевщиков
Александр Витальевич

" 08 " августа 2022 г.

Россия, 197022, Санкт-Петербург,
ул. академика Павлова, д. 12
e-mail: polevshikov.av@iemspb.ru
тел. +7(812)2342929

Подпись Полевщикова А.В.
Удостоверяется
Нач. отдела кадров ОГБНУ «ИЭМ»



В. Ха Саева