

Отзыв официального оппонента

доктора медицинских наук, профессора Гриневича Владимира Борисовича на диссертационную работу Золотарева Василия Авенировича «Нитрергические механизмы гастропротекции в условиях ирритации слизистой оболочки желудка», представленную в диссертационный совет 24.1.137.01 при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН на соискание степени доктора биологических наук по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных.

Актуальность диссертационной работы

Современные методы терапии кислотозависимых заболеваний верхних отделов ЖКТ, к сожалению, не привели к уменьшению распространенности и тяжести течения. Это свидетельствует о непреходящей актуальности экспериментальных и клинических исследований механизмов гастропротекции, к которым относится диссертационная работа В.А. Золотарева.

В клинической практике достаточно изучены механизмы формирования заболеваний, связанных с H. Pylori, факторами агрессии (так называемый кислотно-пептический фактор), иммунологическими механизмами Т и В клеточного иммунитета и рядом других. При этом факторы защиты слизистой оболочки (щелочная компонента желудочного сока, регенерация, микроциркуляторные процессы) изучены по-прежнему недостаточно.

Местные защитные механизмы слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта организуются в сложную динамическую систему взаимосвязанных нервных, эндокринных и паракринных факторов. При этом по-прежнему не решен вопрос об универсальном механизме, координирующем работу всей системы, а также не раскрыт механизм действия гастропротекторов при остром и хроническом повреждении. Продолжает оставаться актуальным поиск новых результатов, которые позволят совершенствовать схем лечения пациентов с заболеваниями органов пищеварения.

Представленная работа заметно дополняет и развивает теорию адаптивной гастропротекции, создавая которую в 1970-е годы, Андре Робер предусматривал использование в целях клинической практики ряда фармакологических агентов, главным образом простагландинов, способных обеспечивать защиту слизистой оболочки. Однако с клинических позиций их эффективность оставляла желать лучшего.

Диссертационная работа содержит новые сведения о нитрергических процессах, интегрирующих защитные реакции. Основное внимание автор уделил регуляции продукции ионов бикарбоната – решающей составляющей механизмов защиты слизистой оболочки желудка (СОЖ) в норме и в условиях деструкции. Работа привносит новый взгляд на роль периваскулярного отека в регуляции щелочной продукции слизистой оболочки. Несомненный практический интерес вызывают представленные диссертантом сведения о зависимости транспорта бикарбонатов на поверхность желудочного эпителия от активности протонного насоса.

Цели и задачи исследования

Целью диссертационной работы было комплексное исследование роли нитрергической системы в регуляции гастропротективных реакций, возникающих в ответ на слабую ирритацию СОЖ.

В задачи работы входило:

1. изучение состояния защитного бикарбонатного барьера на поверхности слизистой оболочки и изменений органного кровотока при полостном воздействии кислым раствором с повышенным осмотическим давлением;
2. оценка влияния собственной секреции кислоты в желудке на состояние бикарбонатного барьера, в том числе на транспорт бикарбонатов из подслизистого слоя на поверхность эпителия;
3. выяснение роли нитрергической регуляции в формировании защитного бикарбонатного барьера и других реакций экзокринной секреции, а также в поддержании органного кровотока на фоне слабой ирритации СОЖ путем оценки влияния нейрональной и эндотелиальной изоформ NOS, а также экзогенного NO;
4. установление значения капсаицин-чувствительных первичных афферентных нервных окончаний в желудке в управлении активностью nNOS и eNOS;
5. оценка степени взаимодействия нитрергической и простагландиновых систем в желудке при ирритации слизистого эпителия.

Научная новизна исследования

Лечение кислотозависимых заболеваний верхних отделов ЖКТ, связанное с применением ингибиторов протонного насоса, а также антибиотиков, ни в коей мере не ослабило устойчивый интерес физиологов и клиницистов к разработке средств, увеличивающих барьерные функции СОЖ и усиливающих органный кровоток. Это особенно важно в связи со все возрастающей частотой применения нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) в общеклинической практике. Тем не менее, современные работы в этой области немногочисленны. Поэтому проведенное автором комплексное исследование локальной регуляции желудочной секреции бикарбонатов в условиях раздражения СОЖ кислым гипертоническим раствором можно рассматривать как приоритетное в силу новизны поставленных задач и примененных экспериментальных методов.

В диссертации предложена концепция, утверждающая значение нитрергической системы как основного модулятора простагландиновых и парасимпатических холинергических реакций на обратную диффузию протонов из полости органа в СОЖ. Представлены ранее неизвестные доказательства специфического участия изоформ конститутивной синтазы оксида азота, эндотелиальной (eNOS) и нейрональной (nNOS), в регуляции желудочной секреции протонов, бикарбонатов и пепсиногена, обоснованы органно-тканевые механизмы такого влияния в базальных условиях и при слабой ирритации слизистой оболочки органа. Впервые продемонстрирована зависимость влияния eNOS от эндогенной кислотности, а также от концентрации бикарбонатов в желудочном кровотоке. Впервые изучено взаимодействие nNOS и eNOS с цикооксигеназами при регуляции секреции HCO_3^- в желудке и органного кровотока.

Теоретическое и практическое значение.

Работа приносит новые фундаментальные сведения в теорию гастропротекции, дополняя понимание интеграции протективных процессов раскрытием роли эндогенного синтеза оксида азота в СОЖ в регуляции продукции бикарбонатов простагландинами и холинергическими вагусными факторами. Впервые исследовано селективное влияние изоформ конститутивной синтазы оксида азота на секрецию бикарбонатов в условиях слабой ирритации СОЖ и показано ведущее значение нейрональной изоформы.

Полученные В.А. Золотаревым данные о зависимости защитного эффекта стимуляции nNOS от конститутивного синтеза простагландинов имеют несомненное практическое значение, т.к. подтверждают необходимости поиска НПВС, максимально селективно действующих на ЦОГ-2, оставляя интактной ЦОГ-1.

Клинический интерес представляет положение диссертации о влиянии ингибиторов протонной помпы (ИПП) на желудочную секрецию бикарбонатов. Известно, что прием ИПП приводит к сокращению нейтрализующей способности слизисто-бикарбонатного барьера. Этот эффект описан в литературе и подтвержден В.А. Золотаревым экспериментально. Работа уточняет границы этого эффекта, показывая, что блокада протонной помпы подавляет не только базальную секрецию бикарбонатов, но и способность СОЖ усиливать продукцию бикарбонатов при вазоконстрикции. Однако следует учитывать, что переносить экспериментальные данные в клиническую практику возможно с достаточной осторожностью. Очевидно, это следует объяснить тем, что у экспериментального животного, крысы, непрерывное питание и относительно постоянная секреция протонов, в то время как у человека питание имеет периодический характер.

Степень обоснованности научных положений и выводов, вынесенных на защиту

Автор сформулировал 6 положений, вынесенных на защиту, и 10 выводов.

Положения, вынесенные на защиту, соответствуют задачам исследования, каждое из положений подкреплено выводами. Положения обосновываются в разделе «Обсуждение и выводы» путем анализа собственных экспериментальных данных и их сопоставления с литературными. Развернутая формулировка положений дана в разделе Заключение.

Главным положением (№2), которое по сути является концепцией, предложенной автором, следует считать утверждение роли нитрергической системы желудка в условиях слабой ирритации СОЖ как основного модулятора простагландиновых и холинергических реакций, поддерживающих бикарбонатный барьер на поверхности желудочного эпителия за счет усиления транспорта бикарбонатов и увеличения органного кровотока.

В теоретическом плане существенным является положение №1, доказывающее, что гастропротективные секреторные и сосудистые реакции возникают при естественном физико-химическом воздействии желудочного химуса во время пищеварения. По сути, этот результат описывает реакции здоровой слизистой оболочки, в своем роде точку отсчета для оценки патологических изменений.

Другие положения развивают первые два, раскрывая механизм нитрергических воздействий на желудочную секрецию бикарбонатов и органного кровотока в условиях ирритации. Эти положения подкреплены приоритетными экспериментальными данными, полученными автором самостоятельно. В частности, на защиту вынесено положение о том, что стимуляция отдельных изоформ конститутивной синтазы оксида азота (nNOS и eNOS) приводит к реципрокным изменениям продукции HCO_3^- : активация nNOS усиливает секрецию HCO_3^- , а стимуляция eNOS, напротив, ослабляет этот процесс (№3). Положение №4 связывает эффект eNOS с уровнем собственной секреции кислоты в желудке и с концентрацией HCO_3^- в капиллярах подслизистого слоя. В работе определена роль циклооксигеназы, как основного посредника действия NO на секрецию HCO_3^- и усиление желудочного кровотока (№5). Также получила подтверждение ведущая роль капсаицин-чувствительных первичных афферентов в управлении активностью синтаз оксида азота при слабой ирритации СОЖ (№6).

Достоверность полученных результатов, выводов и научных положений

Достоверность результатов не вызывает сомнений, что подтверждается обоснованным применением комплекса экспериментальных методов, позволивших оценить совокупность физиологических процессов, включая желудочную секрецию кислоты, бикарбонатов и пепсиногена, а также объемный кровоток в стенке желудка и показатели системной гемодинамики.

Обращает на себя внимание основной экспериментальный метод, использованный в работе, а именно количественная оценка желудочной секреции ионов бикарбоната на основе измерения pH и парциального давления углекислого газа. Этот метод известен в экспериментальной гастроэнтерологии, но применяется редко в связи с техническими трудностями его реализации и требованиями к стандартизации экспериментальных процедур. В подтверждение обоснованности применения данного метода автор в главе «Методы» приводит результаты его верификации *in vitro* и *in vivo*. С большой тщательностью автор подошел к моделированию эффекта так называемого «щелочного прилива». Используя для расчетов результаты собственных измерений, автор минимизировал погрешности квазиэкспериментального плана.

Диссертантом проведена подробная корректная статистическая обработка данных, для которой был в основном применен смешанный дисперсионный анализ. Результаты статистического анализа для всех экспериментальных серий представлены в виде таблиц в Приложении 2, на которые даются единообразные ссылки в тексте и в подписях к соответствующим рисункам.

Качество анализа и достоверность выводов подтверждаются также методологической состоятельностью работы. Анализ результатов базируется на нескольких принятых в экспериментальных исследованиях допущениях, нашедших достаточное подтверждение в литературе. Во-первых, проводя расчеты продукции HCO_3^- в присутствии кислоты, автор исходит из того, что CO_2 в желудочном перфузате появляется исключительно в результате взаимодействия эндогенного HCO_3^- с протонами. Такой подход основан на условиях перфузии желудка без контакта раствора с атмосферой и проведенной автором верификации измерительной системы *in vivo* при разных скоростях перфузии. Во-вторых, теоретическая оценка роли эндотелиальной синтазы оксида азота путем сравнения результатов селективной и неселективной блокады изоформ конститутивной NOS обоснована тем, что эффекты нейрональной и эндотелиальной изоформ являются аддитивными, и ферменты в условиях физиологической нормы не оказывают прямого взаимного влияния, что автор доказывает в главе «Обсуждение».

При обсуждении результатов исследования привлекаются многочисленные литературные источники, в основном зарубежные, которые дают исчерпывающее представление о состоянии проблемы.

Общая характеристика работы, оценка содержания, завершенности и оформления

Диссертант придерживается традиционного плана рукописи, который включает введение, обзор литературы, методы, результаты, обсуждение результатов, общее заключение, выводы, список использованной литературы из 665 ссылок и 2 приложения. Диссертация изложена на 325 страницах, содержит 45 рисунков, 1 таблицу.

Во Введении автор раскрывает актуальность проблемы, а также теоретическое и прикладное значение новых данных о механизмах гастропротекции, в частности, сведений об управлении активным транспортом ионов бикарбоната в СОЖ. В этом разделе

формулируются цели и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, приводятся сведения об апробации работы и личном вкладе автора.

Глава 1, «Обзор литературы», содержит исчерпывающие сведения, касающиеся всех проблем, затронутых в работе. В частности, автор рассматривает современное состояние теории гастропротекции (раздел 1.1), подробно характеризует апикальный и базолатеральный ионный транспорт в СОЖ как динамическую основу защитного слизистобикарбонатного барьера (1.2). Автор также уделяет внимание описанию секреции пепсиногена, рассматривая этот процесс как отдельный фактор поражения верхних отделов ЖКТ (1.3). Автор подробно останавливается на современном понимании роли простагландинов (1.4) и оксида азота (1.5). Раздел 1.6. посвящен описанию физиологической роли капсаицин-чувствительных первичных афферентов в желудке как основного интегратора реакций на химическое раздражение слизистой оболочки.

Глава 2, «Методы исследования», содержит подробное описание методических подходов и обработки результатов. Особое внимание уделено имеющей новаторские черты технике измерения концентрации ионов HCO_3^- в кислой среде, ее верификации *in vitro* и *in vivo* (2.3). Отдельно стоит отметить уникальность примененных хирургических процедур (2.1-2.2). Подробно изложен метод электрического раздражения групп волокон в составе желудочных ветвей вагуса (2.6). В главе даны необходимые сведения о лазер-доплеровской регистрации объемного кровотока в стенке желудка (2.4). Также приведены подробный список использованных фармпрепаратов, их дозировка и пути введения (2.8). Глава «Методы» содержит 3 рисунка.

«Результаты исследований» (**Глава 3**) изложены на 76 страницах и проиллюстрированы 39 сложными графиками. Оценивая в целом представленный материал, необходимо отметить, что автор подводит итог каждого из разделов данной главы, объединяя таким образом разнообразные экспериментальные данные.

Раздел 3.1 описывает вводную серию экспериментов, раскрывшую влияние экзогенной кислоты и полостного осмотического давления на базальную секрецию в желудке бодрствующих и наркотизированных крыс. Раздел 3.2 содержит приоритетные сведения о влиянии избирательной и неизбирательной блокады изоформ конститутивной синтазы оксида азота на секрецию кислоты, бикарбонатов и пепсиногена в желудке в условиях слабого раздражения слизистой оболочки кислым гипертоническим раствором. Раздел 3.3 исследует на модели щелочного прилива зависимость секреции бикарбонатов и пепсиногена от концентрации бикарбонатов в желудочном кровотоке. В этом разделе также анализируется вклад апикальных и базолатеральных транспортеров бикарбонатов в усиление транспорта HCO_3^- из эпителиальных клеток желудка в слой слизи. В разделе 3.4 оценивается роль eNOS и nNOS в регуляции базального либо стимулированного слабыми ирритантами кровотока в желудке. Раздел 3.5 содержит экспериментальные подтверждения роли капсаицин-чувствительных нервных окончаний в управлении нитрергическими реакциями СОЖ, которые приводят к усилению органного кровотока и секреции бикарбонатов в ответ на повышение полостной кислотности. Там же описана взаимосвязь реакции рецепторов переменного потенциала ванилоидных 1-го типа (TRPV1) с eNOS. В разделе 3.6 приведены приоритетные данные о нитрергической потенциации вагусной холинергической секреции бикарбонатов в условиях раздражения СОЖ кислым гипертоническим раствором.

В главе 4 («Обсуждение и выводы») анализируются экспериментальные данные и формулируются основные положения. Глава содержит 3 рисунка. В разделе **Заключение** автор обобщает полученные результаты с точки зрения участия отдельных изоформ NOS в реакции на раздражение СОЖ. Глава завершается 10-ю **выводами**.

Оформление диссертации и автореферата выполнено тщательно. Работа написана стилистически грамотно. Изложение сопровождается многочисленными корректными ссылками на литературные источники. Автореферат соответствует требованиям ВАК, представлен на 45 страницах, полностью соответствует содержанию работы и отражает основные результаты, все положения и выводы.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

Цели и задачи, поставленные в диссертации, полностью раскрыты в результатах. Положения, вынесенные на защиту, соответствуют выводам. Материалы диссертации полностью опубликованы в открытой печати. Основные результаты представлены в 16 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и в 30 публикациях в материалах Всероссийских и международных конференций.

Вопросы и замечания для дискуссии

Принципиальных замечаний к изложению материала исследования и к выводам нет. Однако автору, в связи с приоритетностью некоторых полученных результатов, следовало бы более тщательно подойти к привлечению новых формулировок, таких как «разнонаправленное действие» изоформ синтазы оксида азота.

Следовало бы избегать терминов, имеющих в фундаментальном научном труде жаргонной звучание. Так автор иногда вместо «секреции протонов» использует не вполне корректный оборот «секреция кислоты».

Для дискуссии о роли «щелочного прилива» следует прояснить, какова доля бикарбонатов, синтезированных в желудке, в общем пуле бикарбонатов в системном кровотоке?

В клинической практике существует потребность выяснения механизмов сопряженности желудочной секреции и моторики. Какова роль описанных нитрергических процессов в таком сопряжении?

Заключение

Диссертация В.А. Золотарева «Нитрергические механизмы гастропротекции в условиях ирритации слизистой оболочки желудка» является законченной научно-квалификационной работой, в которой автор на основании самостоятельно проведенных экспериментов и анализа полученных данных сформулировал положения, развивающие фундаментальные представления гастроэнтерологии и имеющие перспективы для практического применения. Автор обосновал новое направление фундаментальных исследований в рамках теории адаптивной гастропротекции – анализ роли отдельных изоформ конститутивной синтазы оксида азота. В результате развития этого направления им была предложена концепция, утверждающая значение нитрергической системы как основного модулятора простагландиновых и парасимпатических холинергических реакций на химическое раздражение СОЖ.

По актуальности темы исследования, методическому уровню, объему результатов и степени достоверности и новизны сделанных выводов, по значимости для развития фундаментальной науки работа В.А. Золотарева соответствует требованиям к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, установленным в п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (с изменениями от 26.05.2020 г), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных.

Официальный оппонент

заведующий 2-й кафедрой (терапии
усовершенствования врачей) Федерального
государственного бюджетного военного
образовательного учреждения высшего
образования «Военно-медицинская академия
имени С.М. Кирова» Министерства обороны
Российской Федерации

доктор медицинских наук, профессор
«10» июня 2022 г.

Гриневич Владимир Борисович

Подпись Гриневича Владимира Борисовича «Заверяю»

Заместитель начальника Федерального
государственного бюджетного военного
образовательного учреждения высшего
образования «Военно-медицинская академия
имени С.М. Кирова» Министерства обороны
Российской Федерации по научной работе



Ивченко Евгений Викторович

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Адрес: Адрес: 194044, г. Санкт-Петербург, улица Академика Лебедева, д. 6, лит. Ж. Тел.: 8(812)292-32-06. Адрес электронной почты: vmeda-na@mil.ru. Адрес официального сайта организации: <https://www.vmeda.org/>