

Отзыв официального оппонента
доктора биологических наук, профессора, главного научного
сотрудника, заведующего лабораторией физиологии возбудимых
мембран ИФ РАН Крылова Бориса Владимировича на диссертационную
работу Кутуковой Надежды Александровны на тему «Механизмы
холинергической регуляции рецепторных функций тучных клеток»,
представленную к защите в Диссертационный Совет 24.1.158.01 на базе
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» на соискание ученой
степени кандидата биологических наук по специальностям
3.3.3. Патологическая физиология и 3.2.7. Иммунология

Актуальность избранной темы исследования

Диссертационная работа Н.А.Кутуковой посвящена актуальной проблеме физиологии и патофизиологии – изучению комплексных механизмов нейро-иммунных взаимодействий. В рамках работы ключевую роль в этих взаимодействиях автор отводит тучным клеткам. Располагаясь повсеместно на границе с внешней средой в барьерных эпителиях и в кровеносных сосудах, тучные клетки обладают широким спектром активационных рецепторов, ориентированных на взаимодействие как с микро- и макроорганизмами, факторами запуска воспаления и продуктами тканевой деструкции, так и на восприятие сигналов нейрогенной природы. Такое разнообразие их рецепторных структур наделяет тучные клетки уникальной способностью отвечать на разнородные сигналы иммунной и нервной систем и позволяет рассматривать их, наряду с нервными окончаниями, в качестве важных тканевых рецептирующих клеток, функционирующих в тесной анатомической и функциональной связи с афферентными нервными волокнами.

Исследования последних лет убедительно доказали физиологическую значимость нейро-мастоцитарных единиц, предусматривающих двустороннюю коммуникацию по ходу всех этапов воспалительной реакции и иммунного ответа. Широкий ряд нейротрансмиттеров модулирует активность тучных клеток, а высвобождаемые мастоцитами биогенные амины, цитокины

и пептиды, в свою очередь, воздействуют на нервные окончания, обеспечивая как генерацию афферентного сигнала, так и модуляцию ответных реакций тучных клеток, клеток эндотелия сосудов, и гладких мышц, что приводит к контролю воспаления.

Вместе с тем, опосредованная ацетилхолином модуляция функциональной активности тучных клеток остается мало изученным аспектом нейро-мастоцитарных взаимодействий. Имеющиеся в литературе данные носят противоречивый характер и не позволяют сформировать единую модель холинергического контроля эффекторных функций тучных клеток.

В связи с этим, проведенное в работе Н.А.Кутуковой систематическое исследование дозозависимых и кинетических эффектов ацетилхолина, точнейшая идентификация рецепторов, опосредующих его разнонаправленные эффекты, и анализ модулирующего влияния нейротрансмиттера на секреторный ответ мастоцитов, обеспечивают высокую актуальность и своевременность представленной работы. Таким образом, тема проведенного диссертационного исследования Н.А.Кутуковой является актуальной для патофизиологии и иммунологии.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Результаты исследования были получены с применением комплекса самых современных высокоинформативных культуральных и гистохимических методов, автоматизированных методов проточной цитометрии, методов фармакологического анализа с использованием агонистов и антагонистов ацетилхолиновых рецепторов, а также биохимических методов для оценки уровня секреторной активности тучных клеток. Выбор методов полностью соответствует поставленным задачам. Достоверность полученных данных подтверждена воспроизводимостью результатов при проведении серии контрольных исследований и корректной статистической обработкой. Сформулированные в диссертационной работе

научные положения полностью обоснованы. Поставленные задачи исследования решены полностью. Выводы соответствуют поставленной цели и задачам.

Научная новизна исследования

В работе Н.А.Кутуковой впервые представлено экспериментальное обоснование дуалистического характера холинергической регуляции функциональной активности тучных клеток. В рамках комплексного исследования, выполненного с использованием современных методов и правильно выбранных клеточных моделей (перитонеальных тучных клеток мыши и мастоцитоподобной линии клеток человека НМС-1), автор проводит сравнительный анализ эффектов ацетилхолина в отношении секреторной функции указанных клеток. Приведенные в работе Кутуковой Н.А. результаты показывают, что холинергическая регуляция зависит на клеточном уровне от исходного исследуемого объекта. Действуя через свои мускариновые рецепторы, ацетилхолин выступает в роли индуктора секреции медиаторов. Одновременно, активируя никотиновые рецепторы, ацетилхолин проявляет себя в качестве ингибитора секреторного ответа тучных клеток, отвечающих на ряд других стимулов. При этом автор детально анализирует дозозависимые и кинетические закономерности холинергической дегрануляции тучных клеток с оценкой пороговой концентрации ацетилхолина, которая находится на уровне наномолярных значений. Важнейшие дополнительные сведения о холинергической модуляции тучных клеток получены при использовании молекулярных аналогов ацетилхолина, карбахолина и ацетилтиохолина, которые вызывают как стимулирующие, так и ингибирующие ответы, обладая при этом селективностью в отношении эндогенных секретируемых медиаторов.

Теоретическая и научно-практическая значимость

В работе раскрываются физиологические и иммунологические механизмы функционирования нейро-мастоцитарной единицы в части эфферентного холинергического воздействия на секреторные функции тучных клеток. Полученные Н.А.Кутуковой результаты убедительно доказывают, что направленность холинергического эффекта в отношении тучных клеток определяется их исходным состоянием. Свойство тучных клеток отвечать немедленным реагированием на тканевое повреждение подтверждает их роль как важных факторов запуска воспаления любого генеза, информация о котором посредством функционирования нейро-мастоцитарной единицы сразу поступает в ЦНС. При этом ответный эфферентный сигнал на начальной стадии воспаления носит добавочный стимулирующий характер, а по ходу разрешения воспалительного процесса меняет свой вектор направленности на противовоспалительный. Этот полученный автором важнейший результат объясняет противоречивый характер многих литературных данных и обладает несомненной значимостью не только для фундаментальной науки, но и с точки зрения практического применения полученных результатов в медицине. Согласно приоритетным результатам Н.А.Кутуковой, ацетилхолин выступает в роли двунаправленного модулятора секреторной активности тучных клеток и способен как инициировать, так и ограничивать их секреторный ответ в зависимости от стадии воспалительного процесса и интенсивности ответов нервных клеток.

Выявленные закономерности могут послужить теоретической основой для разработки новых подходов к контролю воспаления и терапии аллергических заболеваний, опосредованных тучными клетками. В частности, результаты Н.А.Кутуковой могут составить основу принципиально новых терапевтических подходов к описанным феноменам неясного генеза, к которым можно отнести явления холодовой аллергии, холинергической крапивницы, нервного компонента бронхиальной астмы, нейровоспаления различной локализации. Не исключено, что результаты исследования могут

быть востребованы в оториноларингологии, особенно детской, как вероятная основа еще одного механизма полипогенеза.

Полнота изложения материала диссертации в опубликованных научных работах

Результаты диссертационной работы Н.А.Кутуковой опубликованы в 23 печатных работах, 10 из которых являются научными статьями в журналах из перечня ВАК РФ, индексируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science, а 13 – тезисами докладов на всероссийских и международных конференциях.

Материалы исследования были доложены на IV Международном симпозиуме, посвященном не-нейрональному ацетилхолину (Германия, Гиссен, 2014), на Юбилейной научно-практической конференции «Современные проблемы иммунофармакологии, биотехнологии и цитокиновой регуляции», посвященной 40 летию ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России (Санкт-Петербург, 2014), на IV и V Международных симпозиумах «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (Санкт Петербург, 2013, 2015), на Международном форуме «Клиническая иммунология и аллергология — междисциплинарные проблемы» (Казань, 2014), на XIII Всероссийской конференции с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск, 2018), на XV и XVII Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт Петербург, 2015, 2023), XXIV Съезде физиологического общества им. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, 2023 г.), Российской научной конференции с международным участием «Пептиды, гормоны и нервная система», посвященной 100-летию отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова ФГБНУ «Института экспериментальной медицины» (Санкт Петербург 2023 г.), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Учение

академика И.П. Павлова в современной системе нейронаук» (Санкт Петербург, 2024 г.), V и VII Всероссийских конференциях с международным участием «Интегративная физиология» (Санкт-Петербург, 2023 и 2025 гг.). Также результаты работы были представлены и обсуждены на заседании Санкт Петербургского отделения Всероссийского научного общества иммунологов (Санкт-Петербург, 2015). Уровень публикаций и масштабного участия автора в конференциях, длительность научного обсуждения результатов исследования в научном сообществе указывают на тщательный анализ материалов, продуманный и глубокий характер исследования, что еще раз подтверждает обоснованность и достоверность результатов и выводов диссертационной работы.

Структура и объем диссертации

Диссертация Н.А.Кутуковой оформлена согласно ГОСТ Р 7.0.11-2011 «Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления», изложена на 147 страницах машинописного текста, состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений, список литературы. Работа проиллюстрирована 32 рисунками и 21 таблицей. Библиографический указатель содержит 227 источников, в том числе 20 на русском языке и 207 на иностранных языках.

Во Введении отражены актуальность исследования и степень разработанности темы, указаны цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования. Были сформулированы положения, выносимые на защиту, обоснована достоверность результатов и приведены данные об их апробации. Раздел Введение содержит все ключевые моменты, необходимые для предварительного знакомства со структурой работы, ее дизайном и характером полученных результатов.

В Главе 1 (Литературный обзор) приводится подборка современных и классических литературных данных по тематике исследования, которая позволяет получить важные сведения о результатах исследований других авторов, проводимых в России и за рубежом. Автор детально описывает биологию тучных клеток, а также структуру нейро-мастоцитарной единицы. В последних трех подглавах приведены имеющиеся в литературе данные о пептидергической, катехоламинергической и холинергической регуляции этих клеток. Большинство цитированных источников опубликованы за последние 10 лет, что подтверждает масштаб и актуальность исследований по физиологии тучных клеток в мире. Структура обзора предваряет дальнейшее изложение собственных результатов автора, что существенно облегчает восприятие работы в целом.

В Главе 2 дается исчерпывающее описание объектов исследования - моделей тучных клеток (их получения, культивирования, фенотипической и гистохимической характеристики), и используемых для достижения поставленных задач методов. Все методики изложены подробно, что обеспечивает возможность воспроизведения экспериментов.

Результатам собственных исследований автор посвящает основную часть диссертации (50 страниц из 147 страниц общего объема диссертации). Эта Глава 3 состоит из 6 разделов, которые полностью соответствуют поставленным задачам. Результаты проанализированы статистически корректно, изложены логично и последовательно, проиллюстрированы с помощью диаграмм, таблиц и фотографий гистохимических исследований.

В Главе 4 проводится обсуждение полученных результатов. Автор, Н.А.Кутукова, обстоятельно анализирует полученные данные, сопоставляя их с литературными данными. Если Глава 3 дает полное представление о высоком экспериментальном уровне работы и полученных автором важнейших результатах, то материалы Главы 4, их отличный анализ и обобщение, прямо указывают на огромный потенциал Н.А.Кутуковой как перспективного исследователя, объективность и надежность полученных ею

данных, способность к генерации новых идей и к решению самых трудных и многогранных задач в области патофизиологии и иммунологии.

Заключение кратко излагает суть диссертационной работы и обобщает полученные результаты. По научной глубине и уровню обобщений этот раздел является одним из украшений работы Н.А.Кутуковой.

Выводы закономерно вытекают из полученных результатов и их обсуждения и полностью коррелируют с поставленными целью и задачами.

Автореферат полностью соответствует содержанию работы. Следует отметить его прекрасное оформление и точность формулировок.

Существенных замечаний по работе Н.А.Кутуковой не имеется. Можно отметить лишь единичные опечатки и стилистические неточности.

В рамках официальной дискуссии следует задать автору следующие вопросы:

1. По результатам работы и данным литературы установлено взаимодействие тучных клеток и нервных терминалей в рамках нейро-мастоцитарной единицы. При этом одним из важных вопросов остается механизм генерации сигнала в афферентном участке рефлекторной дуги. Какую роль при этом могут играть тучные клетки и как, по мнению автора, может осуществляться генерация и передача сигнала от нее на нервную терминаль?

2. Приведенные в работе результаты свидетельствуют о вероятной смене типа ацетилхолиновых рецепторов на мембране тучных клеток при их активации. Какой механизм подобной смены репертуара рецепторов с мускариновых на никотиновые применительно к тучным клеткам можно предположить?

Заключение

Диссертационная работа Кутуковой Надежды Александровны на тему «Механизмы холинергической регуляции рецепторных функций тучных клеток», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 3.3.3. Патологическая физиология и

3.2.7. Иммунология, является законченной научно-квалификационной работой, направленной на решение актуальной проблемы исследования роли ацетилхолина в регуляции секреторной активности тучных клеток, анализа механизмов нейро-иммунных взаимодействий на различных этапах воспалительной реакции.

Диссертация Кутуковой Надежды Александровны по своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов полностью соответствует требованиям п. 9 и п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842 (в актуальной редакции), утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Кутукова Надежда Александровна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 3.3.3. Патологическая физиология и 3.2.7. Иммунология.

Официальный оппонент:



Крылов
Борис Владимирович

Доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник,
заведующий лабораторией физиологии возбудимых мембран
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской Академии наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской Академии Наук.

199034, наб.Макарова, д.6

Тел.: (812) 328-07-01

E-mail: Pavlov.institute@infran.ru



Подпись руки Кривола Б.В. достоверно
Осиф Соловьева Н.В.
27.9.2016 г.