

ОТЗЫВ

**на автореферат диссертационной работы Кутуковой Надежды Александровны
«Механизмы холинергической регуляции рецепторных функций тучных клеток»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальностям 3.3.3 — Патологическая физиология и 3.2.7 — Иммунология**

Нейро-иммунные взаимодействия являются одним из ключевых звеньев патогенеза широкого спектра заболеваний, а концепция холинергического противовоспалительного пути формирует самостоятельное направление трансляционных исследований. При этом, несмотря на многочисленные данные о взаимодействии тучных клеток с сенсорными и катехоламинергическими терминалями, вопрос о направленности эффектов ацетилхолина в отношении мастоцитов остается дискуссионным. Имеющиеся в литературе сведения одновременно поддерживают как стимулирующий, так и ингибирующий характер действия нейромедиатора, что Н.А. Кутукова корректно фиксирует уже во введении автореферата своей диссертационной работы.

Научная новизна и методологический уровень работы

Основные положения, выносимые на защиту, представляются обоснованными и обладают несомненной новизной. Впервые в рамках единого исследования на двух параллельных клеточных моделях (иммортилизованная линия тучных клеток человека НМС-1, первичная культура перитонеальных тучных клеток мыши) проведен комплексный сравнительный анализ дозозависимых и времязависимых эффектов ацетилхолина. Убедительно показан дуалистический характер холинергического ответа мастоцитов. Так, реакция интактных клеток осуществляется через мускариновые рецепторы (преимущественно подтипа М3) и ацетилхолин выступает активатором секреции гистамина и β -гексозаминидазы, тогда как через $\alpha 7$ -субъединицу никотиновых рецепторов реализуется ограничение дегрануляции, индуцированной классическими либераторами (веществом 48/80, анти-IgE антителами, агрегированным IgG). Принципиально важно, что стимулирующий эффект сохраняется вплоть до наномолярных концентраций нейромедиатора при пролонгации инкубации, что согласуется с представлениями о холинергической регуляции не нейронального направления.

Методологический арсенал работы полностью адекватен поставленным задачам. Автор корректно сочетает культуральные технологии, проточную цитофлуориметрию с иммунофенотипированием тучных клеток, гистохимическое окрашивание толудиновым синим, флуориметрическую оценку высвобождения гистамина модифицированным методом Шора и колориметрическое определение активности β -гексозаминидазы, а также ИФА для количественной оценки ИЛ-4. Особого одобрения заслуживает продуманный фармакологический дизайн, который демонстрирует параллельное использование селективных агонистов (оксотреморин, никотин) и антагонистов (атропин, пирензинин, 4-DAMP, гексаметоний, α -бунгаротоксин), а также стабильных аналогов ацетилхолина — карбахолина и ацетилтиохолина. Это позволило автору корректно разделить вклад мускариновой и никотиновой стимуляции и обосновать рецепторную специфичность каждого из эффектов. Работа с животными выполнена в соответствии с ГОСТ 33215-2014, Европейской конвенцией ETS № 123 и одобрена локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ».

Научная новизна исследования обоснована приоритетными данными, которые дали возможность системного описания патофизиологических и иммунологических аспектов холинергической регуляции тучных клеток. Показано, что их ответ на ацетилхолин определяется исходным функциональным состоянием, а ингибирующий эффект не зависит ни от природы индуктора, ни от связанного с ним сигнального пути. Также, выявлены различия в селективности карбахолина и ацетилтиохолина в отношении секретируемых медиаторов.

Предложенная автором концептуальная модель функциональной пластичности мастоцитов, связанная со сменой профиля холинорецепторов на плазматической и гранулярной мембранах в ходе воспалительного процесса, представляет собой оригинальный научный результат.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы состоит в существенном восполнении пробела в понимании функционирования нейро-мастоцитарной единицы. Получены новые сведения о роли ацетилхолина как двунаправленного регулятора эффекторных функций тучных клеток, зависящего от стадии воспаления и амплитуды нервного импульса. Практическая значимость подкреплена конкретными фармакологическими выводами, которые обосновывают возможность избирательной модуляции активности мастоцитов при воздействии агонистов $\alpha 7$ -никотиновых рецепторов или антагонистов М3-мускариновых рецепторов в зависимости от стадии воспалительного процесса. Это открывает перспективы для разработки новых подходов к лечению аллергических заболеваний и контролю стерильного воспаления нервного генеза.

Достоверность полученных данных обеспечена применением адекватных задачам методов, воспроизводимостью результатов независимых серий экспериментов (использовано 234 животных, репрезентативные выборки клеточных моделей), а также корректной статистической обработкой в среде GraphPad Prism 8.0.2.

Апробация результатов и публикации

По теме диссертации опубликовано 23 печатные работы, из которых 10 статей — в изданиях, включенных в Перечень ВАК РФ, в том числе 8 — в журналах, индексируемых в базе Scopus, и 1 — в издании, входящем в Web of Science. Такой уровень публикационной активности превышает формальные требования для кандидатских работ и свидетельствует о признании научным сообществом полученных результатов.

Замечания и вопросы для дискуссии

Работа выполнена на высоком методическом уровне, однако при ее прочтении возникает ряд вопросов, которые хотелось бы обсудить в ходе защиты:

1. Автором убедительно показано, что стимулирующий эффект ацетилхолина сохраняется в диапазоне вплоть до 10^{-10} М при пролонгации инкубации. Как соотносится данный феномен с десенситизацией мускариновых рецепторов и не является ли смещение пика эффективности к более низким концентрациям при длительной экспозиции отражением частичной десенситизации высокоаффинных М3-рецепторов, а не собственно не-нейрональной регуляции?

2. В заключении высказано важное предположение о смене репертуара мембранных рецепторов за счет слияния гранулярной мембраны с плазмалеммой и о преимущественной локализации $\alpha 7$ -нАХР именно на мембранах гранул. Планируется ли автором прямая экспериментальная проверка этой гипотезы — например, методами иммуноэлектронной или конфокальной микроскопии колокализации $\alpha 7$ -субъединицы с маркерами гранул до и после дегрануляции?

3. Учитывая известную гетерогенность тучных клеток человека по фенотипу — «слизистого» типа (содержащие преимущественно триптазу) и «соединительнотканного» типа (содержащие триптазу и химазу), в какой мере, по оценке автора, полученные закономерности на ТК линии НМС-1 и перитонеальных мыши могут быть экстраполированы на тканевые популяции тучных клеток слизистых оболочек человека, наиболее значимые для клинической аллергологии?

Указанные замечания носят исключительно дискуссионный характер и не снижают общей высокой оценки работы. Отдельные стилистические шероховатости и единичные опечатки (например, «проводилди» на с. 9 автореферата) не влияют на содержательную сторону исследования и легко устранимы при подготовке к печати.

Заключение

Доктор биологических наук, доцент,
заведующая междисциплинарным
научно-исследовательским центром,
профессор кафедры клинической лабораторной
диагностики, общей и клинической иммунологии
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный
медицинский университет» Минздрава России

ОССИИ

Плекхова Н.Г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, д. 2
Тел: +7 (423) 242-97-78
E-mail: plekhova.ng@tgmu.ru