

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Абрамовой Анастасии Юрьевны «Болевая чувствительность у крыс при экспериментальном стрессе в условиях иммунной модуляции», представленную к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.03.01 – физиология

Актуальность исследования

В последнее десятилетие накоплен значительный фактический материал, который свидетельствует о существенной роли иммунных механизмов в процессах ноцицепции и развитии хронических болевых синдромов. Установлено, что активирующиеся при периферическом повреждении иммунные сигнальные пути могут напрямую или опосредованно (через гормональные и локальные нейрональные механизмы) сенситизировать ноцицепторы и изменять функциональную активность спинальных и церебральных структур, участвующих в обработке и нисходящей модуляции болевых сигналов. В свою очередь, показано, что психоэмоциональный стресс, активируя эмоциогенные области мозга, стимулирует продукцию в них факторов нейроиммуноэндокринных взаимодействий – цитокинов. Последние способны модулировать местные молекулярные и нейрохимические процессы, способствуя тем самым стресс-индуцированным перестройкам в опосредуемых этими областями механизмах регуляции болевой чувствительности.

Растущее количество сведений указывает на то, что проявляющиеся в различных условиях нарушения двусторонних отношений между нервной и иммунной системами лежат в основе этиологии множества патологических болевых состояний. Следовательно, современные стратегии лечения разных видов боли должны опираться на интегративный подход, учитывающий вклад нейроиммуноэндокринных взаимодействий. Однако на сегодняшний день многие аспекты таких взаимодействий при ноцицепции остаются неясными. При этом наименее изученными являются иммунозависимые механизмы, обеспечивающие ноцицептивную регуляцию при стрессе, что существенным образом сдерживает разработку эффективных методов коррекции достаточно распространенных в настоящее время пост-стрессорных гипералгезий. В связи со сказанным, актуальность диссертационной работы А.Ю. Абрамовой, посвященной изучению эффектов модуляции активности иммунной системы на болевую чувствительность при острой стрессорной нагрузке, не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования

В результате выполнения диссертационного исследования автором получены принципиально новые данные. Впервые выявлена связь стресс-индуцированных изменений болевой чувствительности с перестройками в иммунных функциях организма в разные временные периоды после острой стрессорной нагрузки и впервые продемонстрирована зависимость эффектов стресса на ноцицептивные и иммунные показатели от уровня активации иммунной системы.

В частности, установлено, что наблюдающееся в первые сутки после иммобилизационного стресса ослабление перцепции болевого раздражения сопровождается инволюцией иммунокомпетентных органов (тимус и селезёнка) и снижением концентраций провоспалительного (интерферон-гамма) и противовоспалительного (интерлейкин 10) цитокинов в плазме крови – изменениями, сохраняющимися в поздний пост-стрессорный период (8 суток). При этом продемонстрировано, что острая стрессорная нагрузка приводит к появлению отрицательных корреляций между ноцицептивными порогами и массой иммунокомпетентных органов, а также увеличению числа взаимосвязей между отдельными иммунными показателями, что наиболее выражено через 8 суток после стресса.

Впервые показано усугубление проноцицептивного и иммунного эффектов негативного эмоциогенного воздействия при активации иммунной системы внутрибрюшинным введением липополисахарида. Как обнаружено автором, инъекция антигена после острой стрессорной нагрузки приводит к усилению перцептуального и эмоционального компонентов болевой реакции и более существенной инволюции тимуса в ранние периоды после воздействия (через 3 и 24 часа), а также к уменьшению системного содержания большинства изученных цитокинов на ранних (интерферон-гамма, фактор некроза опухоли-альфа) и отдаленных стадиях (интерлейкин-1 β) с избирательным повышением уровня интерлейкина-6 в поздний пост-стрессорный период (8 суток). Продemonстрировано, что на ранних стадиях (через 3 и 24 часа) эти изменения сопровождаются проявлением разнонаправленных корреляций между отдельными ноцицептивными и иммунными показателями.

Впервые установлено, что предварительная блокада рецепторов врожденного иммунитета (Толл-подобных рецепторов-4, TLR4) предотвращает пост-стрессорное усиление ноцицептивной чувствительности, способствуя ослаблению перцептуального компонента болевой реакции. При

этом показано, что как внутрибрюшинное введение ингибитора указанных рецепторов CLI-095, так и его инъекция в переднюю поясную кору головного мозга не оказывают влияния на стресс-индуцированную инволюцию иммунокомпетентных органов, но препятствуют повышению системного уровня провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли-альфа, интерлейкины 1β и 6), наблюдающемуся сразу после 24-часового иммобилизационного стресса при нормально функционирующей TLR4-системе. Наряду с этим, в условиях блокады рецепторов врожденного иммунитета автором впервые выявлено уменьшение числа и изменение характера присущих пост-стрессорному периоду взаимосвязей между ноцицептивными порогами и показателями активности иммунной системы.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Достоверность представленных результатов не вызывает сомнений, поскольку она обеспечена современным научным и методическим уровнем работы, применением объективных экспериментальных методов и их адекватностью поставленным задачам, достаточной репрезентативностью выборок и исследованием большого объема фактического материала. Полученные в работе данные соответствуют цели и задачам исследования, подвергнуты корректной статистической обработке с применением непараметрических парных и непарных тестов, а также подробного корреляционного анализа. Результаты работы интерпретированы в согласии с последними достижениями в соответствующей области.

Положения, выносимые на защиту, представляются обоснованными и в достаточной мере аргументированными, подкреплены конкретными результатами, полученными в ходе выполнения отдельных фрагментов исследования. Выводы соответствуют поставленным задачам, логично вытекают из полученных в диссертации экспериментальных данных и согласуются с положениями, выносимыми на защиту.

Материалы диссертационной работы в необходимом объеме отражены в 38 печатных работах, включающих 16 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, из которых 8 статей опубликованы в журналах, индексируемых в базе данных Web of Science. Материалы исследования были неоднократно представлены для обсуждения на научных конференциях и конгрессах разного уровня.

Практическая и теоретическая значимость работы

Полученные в ходе выполненного исследования результаты могут быть использованы соответствующими специалистами в их научно-исследовательской деятельности и быть полезными для клинической практики. Теоретическое значение работы состоит в расширении имеющихся на сегодняшний день представлений о вкладе иммунных механизмов в формирование отдельных компонентов системных ноцицептивных реакций и их модуляцию в различные временные периоды после острого эмоциогенного стресса. Помимо этого, выявленная в работе зависимость стресс-индуцированных изменений в ноцицептивных и иммунологических показателях, а также особенностей взаимосвязей между ними от уровня активности иммунной системы вносит существенный вклад в более глубокое понимание роли последней в системной организации физиологических функций при различных условиях жизнедеятельности организма. В практическом аспекте данные представленного диссертационного исследования открывают новые перспективы для дальнейшего исследования и использования иммуномодуляторов в качестве препаратов для фармакологической коррекции пост-стрессорных гипералгезий. Полученные автором результаты также могут быть полезны для практикующих врачей при прогнозировании возможных последствий острого эмоционального стресса у лиц с системными воспалительными заболеваниями. Материалы работы могут быть использованы в курсах преподавания нормальной и патологической физиологии, неврологии и иммунологии.

Объем и структура работы

Материалы диссертационной работы изложены на 270 страницах печатного текста, проиллюстрированы 43 таблицами и 26 рисунками. Диссертация построена традиционно, оформлена в соответствии с требованиями ГОСТ и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с экспериментальными результатами, обсуждения, заключения, выводов, перечня используемых сокращений и списка цитируемой литературы, который содержит 358 источников (98 отечественных и 260 зарубежных).

Общая характеристика работы

Во **введении** автор, кратко характеризуя известные к настоящему времени сведения по теме исследования, обосновывает актуальность решаемой в

работе проблемы, четко определяет цель исследования и необходимые для ее достижения задачи, характеризует научную новизну и научно-практическую значимость полученных результатов, формулирует положения, выносимые на защиту. Раздел также содержит необходимую информацию об апробации работы и о личном вкладе в нее автора.

Обзор литературы соответствует теме диссертации, отражает современный уровень знаний в исследуемой области и содержит ключевые сведения, необходимые для обоснования поставленных в работе цели и задач. Анализируя внушительное количество отечественных и зарубежных литературных источников разных лет, от ставших классическими до опубликованных в последние годы, автор рассматривает историю развития и современное состояние представлений о болевом и стрессорном ответах как системных реакциях организма. Особое внимание в обзоре уделено полученным в последнее десятилетие новым данным о вовлечении в формирование и интеграцию таких ответов у млекопитающих иммунных механизмов. Обобщая имеющиеся на сегодняшний день сведения, полученные в экспериментах на животных, автор подчеркивает важную роль рецепторов врожденного иммунитета и цитокинов в регуляции болевой чувствительности и стрессорных реакций. В конце каждого подраздела автор подводит итог и указывает на малоизученные вопросы в рассматриваемой области. В качестве перспективного пути для их решения обосновывается применение интегративного подхода к изучению общих нейроиммуноэндокринных механизмов стресса и боли. В целом, литературный обзор отражает хорошую ориентированность автора в сфере его научных интересов и дает читателю полноценное представление о современном состоянии проблемы, решаемой в диссертации.

Во второй главе диссертации дается подробное описание **материалов и методов**, использованных в работе. Представлены сведения об использованной модели стресса и методах оценки отдельных компонентов ноцицептивных реакций, приведены протоколы иммунологических, гистологических исследований и дизайн экспериментов в разных экспериментальных сериях. Особое внимание уделено адекватности методических подходов, обоснованию применяемых доз биологически активных субстанций и определению временных точек фиксации тех или иных показателей, а также корректности использованных методов статистического анализа, что, несомненно, способствует убедительности полученных в работе данных. Приведенные в разделе таблицы и схемы

существенно облегчают понимание довольно сложного дизайна экспериментов в разных сериях.

В третьей главе изложены **результаты** диссертационной работы, полученные автором при реализации четырех экспериментальных серий на лабораторных крысах. Первый подраздел содержит данные о динамических изменениях в состоянии иммунокомпетентных органов, перцептуальном и эмоциональном компонентах ноцицептивной реакции, цитокиновом профиле крови и особенностях корреляционных связей между ноцицептивными и иммунологическими показателями после однократного 24-часового иммобилизационного стресса. В последующих трех подразделах последовательно изложены сведения, характеризующие эффекты иммобилизационного стресса на указанные выше физиологические параметры и их взаимосвязи в условиях модуляции активности иммунной системы посредством внутрибрюшинной инъекции липосахарида или предварительного системного и внутримозгового введения ингибитора Толл-подобных рецепторов CLI-095. Все данные иллюстрированы легко читаемыми графиками, схемами и содержащими цифровой материал таблицами, в которых корректно отражены данные статистического анализа, что дополнительно убеждает в надежности результатов. Общая последовательность изложения хорошо прослеживается и соответствует логике исследования.

В четвертой главе автором проведено **обсуждение** полученных в работе результатов на основе анализа собственных экспериментальных данных и их сопоставления со сведениями, имеющимися в литературных источниках. Отдельно подчеркивается, что применение в данном исследовании интегративного подхода в сочетании с методами многомерной статистики (в том числе, корреляционного анализа) позволило установить неизвестные ранее аспекты участия иммунозависимых процессов в системных механизмах формирования болевых реакций у млекопитающих при острой стрессорной нагрузке, которые указывают на перспективность применения иммуноактивных соединений для дальнейших исследований в этой области.

В главе «**Заключение**» автор обобщает изложенные в диссертационной работе результаты и формулирует концептуальное положение о том, что динамика изменений болевой чувствительности у млекопитающих после стрессорного воздействия во многом определяется выраженностью и характером взаимодействий между иммунной и ноцицептивной системами.

Обосновывается практическая значимость полученных в работе данных об антиноцицептивных эффектах иммуномодуляторов, в частности, блокатора рецепторов врожденного иммунного ответа, как основы для разработки новых лекарственных средств для комплексной терапии болевых синдромов различной этиологии.

Диссертация завершается 14 выводами, перечнем используемых сокращений и списком цитируемой литературы. Список литературы хорошо выверен и соответствует требованиям ГОСТ.

Работа в целом производит хорошее впечатление. Она написана правильным, понятным научным языком, читается с интересом и представляет собой единое целое, отдельные части которого логично связаны между собой. Все заимствованные сведения сопровождаются корректными ссылками на источники.

Автореферат диссертации соответствует требованиям ВАК РФ, изложен на 49 страницах, соответствует содержанию работы, отражает ее основные результаты, положения и выводы. Встречающиеся в текстах диссертации и автореферата опечатки и неудачные выражения единичные и не портят в целом *положительное* впечатление от работы.

Замечания и вопросы по диссертации

Наряду с отмеченными достоинствами диссертации, в ней имеются некоторые недостатки. Кроме того, при ознакомлении с работой возникло несколько дискуссионных вопросов.

Замечания:

1. В качестве графиков, демонстрирующих изменения медиан изучаемых в работе показателей, использованы столбчатые диаграммы, тогда как более информативными были бы ящичные диаграммы (диаграммы размаха), которые позволяют более полно охарактеризовать непараметрическое распределение значений в выборке.
2. Для верификации места инъекций ингибитора Толл-подобных рецепторов в переднюю поясную кору использовали метод электрокоагуляции, тогда как более подходящим для этого методом представляется инъекция эквивалентного объема гистологического красителя, которая позволила бы судить не только о локализации, но и зоне распространения вещества.

Вопросы:

1. Как можно объяснить наблюдавшиеся в Ваших экспериментах различия в динамике перцептуального и эмоционального компонентов ноцицепции? Не может ли это быть связано с тем, что при их оценке использовали ноцицептивные стимулы разной природы (в первом случае - светотермальное, во втором – электрическое воздействие)?
2. О каких процессах могут свидетельствовать продемонстрированные Вами изменения корреляционных связей между иммунными и ноцицептивными показателями? Демонстрируют ли они усиление интеграции иммунных и ноцицептивных механизмов или их разобщение?
3. В какой мере по изменениям в цитокиновом профиле плазмы крови мы можем судить об уровне продукции цитокинов в структурах мозга? Известно ли что-то о связи между этими показателями при стрессе?

Высказанные замечания и вопросы не являются принципиальными и не умаляют достоинств диссертационной работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Абрамовой Анастасии Юрьевны «Болевая чувствительность у крыс при экспериментальном стрессе в условиях иммунной модуляции», научный консультант – чл.-корр. РАН, д.м.н., проф. С.С. Перцов, является целостным, законченным научно-квалификационным трудом, выполненным автором самостоятельно. Работа написана единолично, свидетельствует о высокой профессиональной подготовленности автора и содержит новые научные результаты и положения, касающиеся роли нейроиммунных взаимодействий в механизмах регуляции болевой чувствительности при эмоциональном стрессе, совокупность которых может быть квалифицирована как научное достижение, вносящее существенный вклад в теоретические основы физиологии и способствующее решению ряда актуальных для нее прикладных задач.

По актуальности темы, методическому и научному уровню, новизне и научно-практической значимости полученных результатов, обоснованности научных положений и выводов диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного

Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, с изменениями от 01.10.2018 г. № 1168, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а ее автор Абрамова Анастасия Юрьевна заслуживает присуждения искомой степени доктора медицинских наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Официальный оппонент

доктор биологических наук,
заведующий лабораторией кортико-висцеральной физиологии
ФГБУН Институт физиологии им. И.П.Павлова Российской академии наук
Любашина Ольга Анатольевна

Почтовый адрес: 199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

Тел.: 8 (813) 70 72-501

E-mail: lyubashinaoa@infran.ru

Наименование организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

Тел.: 8 (812) 328-07-01, 8 (812) 328-13-01

E-mail: Pavlov.institute@infran.ru

Должность в организации: заведующий лабораторией

«29» сентября 2020 г.

Подпись руки *Любашина О.А.* удостоверяю
ст. инспектор *Мартынов В.В.*
«29» 09 2020 г.

