

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России

академик РАН, д.м.н.

М.В. Дубина

2020 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости диссертации
Абрамовой Анастасии Юрьевны «Болевая чувствительность у крыс при
экспериментальном стрессе в условиях иммунной модуляции»,
представленной к защите на соискание ученой степени доктора медицинских
наук по специальности 03.03.01 – физиология

Актуальность исследования. Одним из подходов к изучению механизмов развития боли является оценка участия иммунной системы в формировании ноцицептивных реакций. Однако, несмотря на большое количество работ, доказывающих роль иммунных факторов в механизмах развития боли, ни в одном официальном перечне болеутоляющих средств не указаны иммуноактивные препараты.

Известно, что болевые синдромы часто являются следствием воздействия на человека стрессовых факторов. По данным целого ряда исследований, стресс оказывает модулирующее влияние на болевые реакции у млекопитающих. Воздействие стрессогенных факторов может приводить к самым различным, в том числе противоположным изменениям ноцицептивной чувствительности. Формирование стрессорной патологии во многом обусловлено нарушением нейроиммунной регуляции физиологических функций. Существенно, что выраженность, характер и направленность постстрессорных изменений иммунных реакций в организме млекопитающих во многом зависят от вида, длительности и интенсивности стресса.

В плане исследования нейроиммунных механизмов, лежащих в основе системной организации физиологических функций млекопитающих в разных условиях жизнедеятельности, значительное внимание привлекают цитокины. За последнее десятилетие накоплены данные, иллюстрирующие значимые

изменения цитокинового профиля тканей при отрицательных эмоциогенных воздействиях. Установлено, что как острые, так и хронические стрессорные нагрузки приводят к повышению уровня ряда провоспалительных цитокинов. Выраженность колебаний уровня цитокинов может различаться в зависимости от временной стадии постстрессорного периода, а также от вида стрессорного воздействия. Важная роль цитокинов в формировании болевых синдромов показана не только в механизмах формирования физиологической боли, но и при различных патологических состояниях. К ним относятся воспалительная боль, нейропатические боли разного генеза, боли при раке молочной железы, дегенеративных заболеваниях межпозвоночных дисков, и многие другие.

Большое внимание при изучении иммунозависимых механизмов реализации стрессорного ответа у млекопитающих уделяется иммунокомпетентным органам – тимусу, селезенке и другим. Ведущую роль в регуляции их функций играет гипоталамо-гипофизарная система. Усиление продукции глюкокортикоидов под влиянием АКТГ приводит к подавлению клеточного и гуморального иммунного ответа, что связано, в том числе, с поддержанием определенного соотношения про- и противовоспалительных цитокинов. Глюкокортикоиды оказывают иммуносупрессивное действие за счёт снижения активности и подавления пролиферации клеток макрофагального ряда. Инволюция тимуса входит в классическую триаду Селье – «синдром биологического стресса», проявления которого включают в себя также гипертрофию коркового слоя надпочечников и изъязвления желудочно-кишечного тракта. Уменьшение массы этого органа является одним из надежных критериев при верификации состояния стресса.

Для изучения иммунных механизмов реализации физиологических и патологических процессов в экспериментальных исследованиях широко применяются липополисахариды – ЛПС, которые относятся к типичным антигенам и входят в состав мембраны клеток патогенных микроорганизмов. На сегодняшний день имеются доказательства участия ЛПС в формировании ноцицептивных и стрессорных реакций у млекопитающих. ЛПС являются специфическими лигандами рецепторов врожденного иммунного ответа – Толл-подобных рецепторов 4 (TLR4). Эти рецепторы являются ключевым молекулярным звеном в механизмах врожденного иммунного ответа, составляют первую линию защиты от инфекций, сигнализируя о присутствии патогенов, а также играют ведущую роль в регуляции продукции цитокинов. Важно, что помимо ЛПС, типичных представителей патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP), лигандами TLR4 могут служить и дистресс-ассоциированные молекулярные паттерны (DAMP) –

эндогенные вещества, продуцируемые различными клетками, в том числе, при стрессорных воздействиях.

Перспективным подходом к предупреждению или снижению степени иммунной дисфункции как при нарушениях болевой чувствительности, так и в условиях стрессорных воздействий может быть применение блокаторов TLRs. Одним из таких соединений является TAK-242, или CLI-095 – селективный ингибитор TLR4, широко использующийся в экспериментах на животных для изучения иммунозависимых механизмов формирования различных состояний в условиях физиологической нормы и при патологии. Влияние блокаторов TLRs на ноцицептивную чувствительность показано при разных способах их введения. Установлено, что системное введение CLI-095 предотвращает развитие нейропатической боли и аллодии у животных. Продемонстрировано, что инъекция CLI-095 в префронтальную кору мозга препятствует формированию стресс-индуцированной хронической висцеральной боли.

Несмотря на значительный интерес к исследованию физиологических механизмов, лежащих в основе изменений болевой чувствительности при отрицательных эмоциогенных нагрузках, многие вопросы в этой области не решены. Остаются малоизученными иммунные процессы, протекающие на различных стадиях после острых стрессорных воздействий. Практически отсутствуют сведения о специфике изменений компонентов ноцицептивного ответа в динамике постстрессорного периода. Отрывочны и фрагментарны данные о влиянии антигенного воздействия, в частности, путем применения иммуноактивного вещества природного происхождения – ЛПС – на болевую чувствительность млекопитающих в разные временные строки после стрессорной нагрузки. Недостаточно изучен вопрос о роли рецепторов врожденного иммунного ответа – Толл-подобных рецепторов, основными лигандами которых являются ЛПС и некоторые эндогенные DAMP, в регуляции болевой чувствительности млекопитающих при эмоциогенных воздействиях. Актуальность рецензируемой диссертационной работы А.Ю. Абрамовой определяется тем, что ее исследование посвящено решению вышеизложенных насущных проблем.

Научная новизна исследования. На основании выполненных исследований разработана новая научная идея, обогащающая представления о системной регуляции физиологических функций у млекопитающих в разных условиях жизнедеятельности. Предложена оригинальная научная гипотеза о том, что взаимосвязь между компонентами интегративной болевой реакции определяется направленностью иммунных процессов, обеспечивающих

поддержание гомеостаза организма. Получены приоритетные данные о роли нейроиммунных взаимодействий в механизмах формирования болевой чувствительности при активации или подавлении иммунных реакций в условиях отрицательной эмоциогенной нагрузки. Установлено, что иммуномодуляция путем антигенного воздействия или блокады рецепторов врожденного иммунного ответа оказывает специфическое влияние на стресс-индуцированные изменения параметров ноцицепции и иммунных показателей.

Достоверность и обоснованность результатов исследования. Полученные в работе А.Ю. Абрамовой данные не вызывают сомнения ни со стороны концептуального построения поставленных задач, ни с точки зрения их биологической и клинической значимости. Достоверность результатов исследования А.Ю. Абрамовой очевидна, поскольку все данные получены с использованием современных экспериментальных методик, включающих в себя комплекс поведенческих, морфологических и биохимических подходов. Статистическая обработка результатов выполнена адекватными методами в соответствии с современными требованиями к анализу биомедицинских данных. Результаты работы являются новыми и статистически значимыми. Изложенные в работе выводы обоснованы тщательным анализом и сопоставлением собственных и литературных данных.

Практическая и теоретическая значимость работы. *Теоретическое значение* работы определяется расширением знаний об иммунных механизмах реализации ноцицептивных реакций у млекопитающих в динамике после отрицательной эмоциогенной нагрузки. Представлены новые доказательства, указывающие на роль иммуноактивных соединений – липополисахарида и ингибитора Толл-подобных рецепторов – в системной организации физиологических функций и регуляции болевой чувствительности при стрессорных воздействиях. Выявлены специфические взаимосвязи между иммунологическими и ноцицептивными показателями в разные временные периоды после острой стрессорной нагрузки при иммуномодуляции путем антигенного воздействия и блокаде рецепторов врожденного иммунного ответа. Материалы исследования целесообразно использовать в курсе преподавания нормальной физиологии, патологической физиологии, неврологии и иммунологии.

Практическая значимость исследования определяется тем, что результаты выполненной экспериментальной работы, включающей в себя комплексный анализ ноцицептивных и иммунологических параметров в

динамике формирования отрицательных эмоциональных состояний, могут быть использованы в клинической практике при разработке новых подходов к фармакологической коррекции стресс-индуцированных изменений болевой чувствительности с применением иммуноактивных соединений.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 270 страницах печатного текста, иллюстрирована 43 таблицами и 26 рисунками. Работа включает в себя следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы». Список литературы содержит 358 источников, из них 98 отечественных и 260 зарубежных.

Общая характеристика работы. В разделе «Введение» показана актуальность выбранной темы, сформулированы цель и задачи исследования, представлена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В разделе «Обзор литературы» А.Ю. Абрамова описывает современные аспекты изучения проблем боли и стресса, а также участие иммунной системы в механизмах их формирования. Особое внимание в данном разделе посвящено иллюстрации роли иммунных факторов, таких как цитокины, рецепторы врожденного иммунного ответа, лиганды Толл-подобных рецепторов (PAMP и DAMP) – в механизмах ноцицепции и стресса. Наглядно продемонстрированы попытки новых подходов в перспективах применения ряда иммуноактивных соединений в терапии хронических болевых синдромов.

В главе «Материалы и методы исследования» представлены схемы проведения экспериментов; подробно описана экспериментальная модель стрессорного воздействия; отражены методики определения различных компонентов ноцицептивной чувствительности у крыс; продемонстрированы алгоритмы оценки состояния иммунокомпетентных органов; описаны методы иммунных анализов определения содержания цитокинов в сыворотке крови животных; дано наглядное изложение гистологического исследования срезов головного мозга крыс. Четко и подробно изложены современные методы и подходы статистической обработки и анализа полученных в работе данных.

В главе «Результаты исследований» А.Ю. Абрамовой изложены собственные результаты проведенных экспериментов.

Представлены новые данные о специфике изменений компонентов ноцицепции у крыс в динамике после однократного длительного стрессорного воздействия на модели 24-ч иммобилизации. Установлено, что стресс-индуцированная аналгезия, проявляющаяся в ослаблении перцепции болевых раздражителей, наблюдается в ранние (1-е сутки), но не в поздние сроки после эмоциогенной нагрузки (8-е сутки).

Показано, что нарушения ноцицептивной чувствительности животных на изученных стадиях после острой стрессорной нагрузки сопровождаются выраженными изменениями показателей иммунных функций: инволюцией иммунокомпетентных органов (тимуса и селезенки), колебаниями показателей цитокинового профиля крови. Существенно, что в отдаленный постстрессорный период – на 8-е сутки – происходит снижение уровня как провоспалительного цитокина ИФН- γ , так и противовоспалительного ИЛ-10.

Показано модулирующее влияние антигенного воздействия путем системного введения ЛПС на болевую чувствительность и иммунные параметры в динамике после 24-ч иммобилизационного стресса. Совместное действие стресса и антигена приводит к усилению перцепции ноцицептивных раздражителей у крыс через 3 ч и на 8-е сутки, а степени эмоционального восприятия боли – лишь в самые ранние сроки постстрессорного периода. Показано, что повышение ноцицептивной чувствительности в указанных условиях сопровождается инволюцией иммунокомпетентных органов. При этом выявлено снижение уровня цитокинов в крови на самых ранних (ИФН- γ , ФНО- α) и отдаленных стадиях исследования (ИЛ-1 β).

Представлены новые доказательства того, что характер действия блокады рецепторов врожденного иммунного ответа на стресс-индуцированные изменения болевой чувствительности животных зависит от способа введения ингибитора Толл-подобных рецепторов 4. Выявлено, что усиление перцепции ноцицептивных раздражителей сразу после 24-ч иммобилизационного стресса не наблюдается в условиях предварительной внутрибрюшинной инъекции CLI-095. Показано, что введение этого ингибитора в переднюю поясную кору мозга не влияет на обнаруженные после стрессорной нагрузки особенности перцептуального и эмоционального компонентов ноцицепции.

Продемонстрировано, что блокада Толл-подобных рецепторов 4 у крыс не влияет на выявленную после 24-ч иммобилизации инволюцию иммунокомпетентных органов (тимуса и селезенки), но оказывает модулирующее воздействие на показатели цитокинового профиля крови. Выявлено, что вызванное стрессом повышение уровня провоспалительных

цитокинов ИЛ-6 и ФНО- α в сыворотке не наблюдается после предварительной внутрибрюшинной инъекции CLI-095. Концентрация ИЛ-1 β и ФНО- α в крови животных уменьшается сразу после 24 ч иммобилизационного стресса в условиях блокады рецепторов врожденного иммунного ответа путем системного или внутримозгового введения CLI-095.

Изложены новые данные о специфических особенностях взаимосвязей между ноцицептивными и иммунными показателями в динамике после 24 ч иммобилизационного стресса при изменении иммунного статуса организма. Установлено, что отрицательная эмоциогенная нагрузка у крыс приводит к росту числа взаимозависимостей изученных физиологических параметров; наибольшее количество связей между иммунными показателями обнаружено на поздней стадии наблюдений (8-е сутки). Антигенное воздействие путем внутрибрюшинной инъекции ЛПС после иммобилизации сопровождается наличием корреляций между анализируемыми параметрами через 3 ч и на 1-е сутки исследований, что иллюстрирует тесное межсистемное взаимодействие иммунных и ноцицептивных процессов в этих условиях уже на самых ранних сроках постстрессорного периода. Обнаружено, что предварительная блокада Толл-подобных рецепторов вносит вклад в предупреждение чрезмерного напряжения физиологических функций у крыс при эмоциогенной нагрузке: системное или внутримозговое введение CLI-095 вызывает уменьшение числа и изменение характера взаимосвязей между иммунными и ноцицептивными параметрами у крыс сразу после 24-ч иммобилизационного стресса.

В главе «Обсуждение результатов» достаточно полно и корректно сопоставлены и обобщены полученные результаты экспериментальных исследований. Проанализированы возможные механизмы формирования ноцицептивных и стрессорных реакций при антигенном воздействии и при подавлении иммунного ответа. Продемонстрирован концептуальный подход в изучении актуальных задач, поставленных в работе.

На основании полученных в исследовании результатов выдвинут ряд предположений, иллюстрирующих роль иммунной системы в механизмах болевых и стрессорных реакций.

В главе «Заключение» автор приводит обобщающие тезисы, отражающие концепцию работы, приводит краткий обзор полученных результатов; подчеркивает, что представленные данные о роли иммуномодуляторов, в частности, блокатора рецепторов врожденного иммунного ответа в регуляции ноцицептивной чувствительности могут лечь в основу разработки новых лекарственных средств для комплексной терапии болевых синдромов различной этиологии.

«Выводы» диссертации резюмируют полученные данные, точно отражают поставленные в работе задачи, являются обоснованными и достоверными. «СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ» насчитывает 358 источника, из них 98 отечественных и 260 зарубежных.

Замечания по диссертации. Принципиальных замечаний, способных поставить под сомнение результаты и выводы диссертации, нет. Есть один вопрос, который не влияет на общую *положительную* характеристику работы: Почему были выбраны разные методы иммунного анализа содержания цитокинов в сыворотке крови животных и в чем принципиальная разница предпочтения той или иной методике?

Заключение. Диссертация Абрамовой Анастасии Юрьевны на тему «Болевая чувствительность у крыс при экспериментальном стрессе в условиях иммунной модуляции», научный консультант – чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор С.С. Перцов, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной задачи – выявление особенностей формирования ноцицептивной чувствительности у крыс при активации или подавлении иммунных реакций в условиях острой стрессорной нагрузки.

По методическому уровню, новизне и научно-практической значимости полученных результатов диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, с изменениями от 01.10.2018г. № 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.

Отзыв подготовлен член-корреспондентом РАН, главным научным сотрудником А.С. Симбирцевым, обсужден и утвержден на расширенном научном семинаре лаборатории биохимии белка ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России от 22.09.2020, протокол № 2.

Член-корреспондент РАН,
главный научный сотрудник
ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России

А.С. Симбирцев

197110, Санкт-Петербург, Пудожская ул., д.7
Тел. 8(812)4991638, a.s.simbirtsev@hpb.spb.ru

23.9.2020