

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертацию Концевой Галины Владимировны «Активация мукозального иммунитета легких неинфекционными стимулами» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – Физиология

Актуальность темы диссертационной работы

Мукозальный иммунитет легких, представленный механизмами неспецифической резистентности и рядом гуморальных и клеточных механизмов, играет ключевую роль в распознавании и элиминации потенциально опасных патогенов. Механизмы защитного реагирования мукозального иммунитета легких на инфекционные стимулы к настоящему времени достаточно хорошо изучены. Недавние исследования показали, что социальные хемосигналы, сопряженные с повышением инфекционных рисков, связанных с размножением, активируют мукозальный иммунитет легких. Однако механизмы такой активации мукозального иммунитета остаются практически неизученными и требуют новых методических подходов к решению одной из актуальных проблем современной биологии и медицины – исследованию механизмов, ограничивающих внутрипопуляционное распространение инфекции.

Известно, что при ольфакторном исследовании запаховых меток ноздри мышей прямо соприкасаются с субстратом. Это приводит к попаданию на поверхность слизистой носа субмикронных и наноразмерных частиц пыли и крупномолекулярных белковых молекул. При этом сигнальная роль содержащихся в моче белков активно исследуется, а значение наноразмерных частиц и их влияние на респираторную систему остается вне поля зрения исследователей. Интерес к анализу физиологических эффектов наночастиц определяется, в первую очередь, проблемами нанобиобезопасности, значимость которой связана с загрязнением окружающей среды твердыми аэрозолями, в том числе наноразмерными частицами.

Хорошо известно, что различные паттерны реагирования на инфекционные стимулы определяются генетически детерминированными особенностями иммунитета, в частности преобладанием клеточного или гуморального иммунного ответа. Однако генетически детерминированные особенности реагирования на неинфекционные стимулы, в частности, половые хемосигналы самок и наночастицы, остаются практически неизученными. Поэтому абсолютно ясна значимость диссертационного исследования Г. В. Концевой, посвященного детальному исследованию генетически детерминированных особенностей реагирования мукозального иммунитета легких на неинфекционные стимулы – половые хемосигналы самок и наночастицы.

Достоверность и обоснованность полученных результатов

Диссертационная работа Концевой Галины Владимировны изложена на 134 страницах по традиционной схеме и включает введение, обзор литературы, методический раздел, результатов исследования и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа проиллюстрирована 11 таблицами и 26 рисунками. Библиографический список включает 7 отечественных и 198 зарубежных источников. Диссертация написана хорошим литературным языком. Результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях и опубликованы в 4-х статьях в журналах, в том числе одна – в зарубежном.

Обзор данных, представленных в литературных источниках, дает исчерпывающее описание современных представлений о защитных нейроиммуноэндокринных механизмах реагирования мукозального иммунитета легких на инфекционные стимулы и об особенностях этих механизмов у животных, различающихся по типу иммунного ответа. Кроме того, автором представлен обзор последних достижений в области исследования активации мукозального иммунитета легких неинфекционными стимулами, сопряженными с повышением инфекционных рисков, связанных с размножением, такими как хемосигналы самок и наночастицы.

В главе «Материалы и методы исследования» описаны условия содержания, сведения об общем количестве исследованных животных и числе животных в каждой экспериментальной серии. Дано детальное описание схем проведения экспериментов, установки для экспозиции мышей аэрозолями наночастиц, разработанной в лаборатории, а также методик определения иммуно-эндокринного статуса животных. Объектом исследования послужили аутбредные лабораторные мыши и мыши двух инбредных линий BALB/c и C57Bl, которые характеризуются генетически детерминированным преобладанием гуморального и клеточного иммунного ответа, соответственно. Методически работа выполнена на современном уровне, с применением необходимых контролей. В разделе «Статистическая обработка данных» представлены использованные методы обработки полученных данных.

Глава «Результаты исследования» содержит подробное изложение и анализ полученных результатов исследования. Первый раздел посвящен изучению иммуно-эндокринной реакции на интраназальную аппликацию мочи самок и бактериального липополисахарида (ЛПС) у самцов инбредной линии мышей. Автор демонстрирует, что интраназальная аппликация мочи самок уже через 2 часа после воздействия обеспечивает эффективную мобилизацию лейкоцитов в легкие без развития стресс-реакции, что радикально отличается от эффектов ЛПС, вызывающего повышение концентрации ИЛ-1 β в гипоталамусе и кортикостерона в крови. В следующем разделе проводится оценка зависимости иммуно-эндокринной реакции на хемосигналы самок и бактериальный липополисахарид от генотипа самцов. Было показано, что интраназальное введение мочи самок, как и бактериального ЛПС вызывает

одинаковое увеличение лейкоцитарной интервенции в легкие, оцененной по числу иммунокомпетентных клеток и концентрации белка в бронхоальвеолярных смывах только у самцов мышей линии BALB/c, характеризующейся преобладанием гуморального иммунного ответа, но не линии C57Bl. При этом моча самок вызывала значимо меньшую, по сравнению с ЛПС, стресс-реакцию. В следующем эксперименте по исследованию эффектов дистантной экспозиции запахом мочи самок и феромоном самок 2,5-диметилпиразином, было показано, что оба хемосигнала вызывают менее выраженную, по сравнению с интраназальным введением, реакцию. Оба хемосигнала не вызывали интервенции лейкоцитов в легкие у обеих линий мышей, однако у самцов линии BALB/c их пероксидазная активность значимо возрастала в ответ на суточную экспозицию запахом мочи самок. Из полученных автором данных следует, что половые хемосигналы самок вызывают мобилизацию неспецифического иммунитета легких только у мышей с преобладанием гуморального иммунного ответа.

Еще 2 эксперимента посвящено изучению реакции мукозального иммунитета легких на наночастицы оксида кремния у самцов лабораторных мышей линий BALB/c и C57Bl при остром и хроническом воздействии. Так, автором было установлено, что в ответ на однократное интраназальное введение наночастиц вызывало мобилизацию лейкоцитов в легкие самцов только линии BALB/c, что хорошо согласуется с межлинейными различиями по реакции на половые хемосигналы, тогда как у самцов линии C57Bl возрастало количество лейкоцитов в крови. Через 10 дней хронического воздействия аэрозолем наночастиц было обнаружено, что содержание кремния возрастало в обонятельных луковицах в 3,5 раза, а в почках в 1,5 раза.

В разделе "Обсуждение результатов" автор проводит анализ полученных в работе данных, основываясь, в первую очередь, на собственных работах лаборатории генетики лабораторных животных и на привлеченных данных из современных литературных источников.

Цель и задачи исследования четко сформулированы, выводы полностью обоснованы результатами исследования. Материал диссертации получен, обработан и проанализирован автором лично, за исключением специально оговоренных случаев. Спектр используемых методик исследования и обработки полученных данных широк и соответствует поставленным задачам. Таким образом, все вышесказанное позволяет считать результаты диссертационной работы достоверными, а положение, выносимое на защиту и выводы обоснованными.

Автореферат по представленным в нем результатам и выводам соответствует диссертации. Качество и количество публикаций соответствует требованиям, предъявляемым Высшей Аттестационной Комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации.

Новизна полученных результатов и выводов

В представленной работе автор рассматривает активацию мукозального иммунитета легких в ответ на социально значимые сигналы, сопряженные с повышением инфекционных рисков, как новый пример сигнальной адаптации. В рамках исследования впервые показано, что запах самок, как сигнал к размножению, вызывает мобилизацию лейкоцитов в легкие уже через 2 часа после начала воздействия. Такая быстрая мобилизация неспецифической иммунной защиты способна значительно снизить риск инфицирования при поиске полового партнера, что имеет важное адаптационное значение. При этом в работе впервые было установлено, что эта реакция зависит от генотипа самцов и более выражена у животных с преобладанием гуморального иммунного ответа. В отличие от воздействия таких стимуляторов неспецифического иммунного ответа, как ЛПС, хемосигналы самок вызывают мобилизацию лейкоцитов в легкие без существенной активации провоспалительных цитокинов и ГНС. Данные, полученные автором в экспериментах по воздействию наночастиц, в целом согласуются с данными других авторов, показавших, что наночастицы активируют механизмы неспецифического иммунитета легких. Однако они также в значительной степени дополняют имеющиеся представления о патофизиологическом действии наночастиц. Так, в представленной работе впервые показано, что генотип играет существенную роль в реакции на наночастицы. Самцы мышей с преобладанием клеточного или гуморального иммунного ответа демонстрируют различные паттерны реагирования на наночастицы. Кроме того, показано, что однократное интраназальное введение наночастиц оксида кремния вызывает активацию ГНС.

Значимость для науки и практики

Результаты данного исследования позволяют расширить имеющиеся представления о механизмах выявленного нового примера сигнальной адаптации и вносят вклад в понимание механизмов, сдерживающих внутривидовое распространение инфекций.

Полученные в ходе диссертационного исследования данные о влиянии хемосигналов самок на иммуно-эндокринную функцию самцов, могут найти применение при регламентации норм содержания лабораторных животных, используемых в иммунологических исследованиях, при профилактике респираторных инфекций у экспериментальных и сельскохозяйственных животных. Данные о различных паттернах реагирования на неинфекционные стимулы у животных с разными генотипами могут быть использованы при выборе объекта для исследований в нанотоксикологии, а также при разработке критериев индивидуальной восприимчивости рабочих к негативному влиянию наноразмерных аэрозолей производственной среды.

Результаты, полученные Г.В. Концевой, могут быть использованы в исследованиях, проводимых в ФГБУН Институт эволюционной физиологии им. А.Н.Северцова РАН, ФГБУН Институт физиологии им. Павлова РАН, ФГБУН

Институт систематики и экологии животных СО РАН, ФГБУН НИИ фундаментальной и клинической иммунологии СО РАН и др.

Недостатки и общие замечания

В то же время к работе есть ряд вопросов и замечаний.

1. Работа проведена на разных линиях мышей. Во введении есть обоснование использования линий C57Bl и BALB/c в связи с разными типами иммунного ответа (преобладание клеточного либо гуморального ответа). Однако в эксперименте 1 использована линия мышей ICR, обоснование использования этой линии отсутствует, и сама линия не описана с точки зрения иммунного ответа.

2. Почему в экспериментах 1 и 2 был использован нестандартный световой режим 14:10 вместо стандартного 12:12, как для экспериментов 3-5?

3. Описание методов начинается с описания общих схем пяти проведенных экспериментов. Было бы логичным для каждого из проведенных экспериментов указать его цель и роль в решении задач исследования. Для экспериментов 1 и 3 такое обоснование отсутствует.

4. В разделе «методики» подробно описаны способ получения и контроль размера наночастиц Таркосила 25, однако отсутствует подобное описание для микрочастиц.

5. Статистические методы описаны достаточно скупо. Проводилась ли коррекция Greenhouse-Gesser на множественность сравнений при выполнении дисперсионного анализа? Какая модель использовалась (Repeated measures, Main effects)? Не описаны параметры при использовании метода главных компонент, в частности, какими критериями руководствовались при выборе значимых факторов, проводилось ли вращение координат (Varimax) для разделения факторов.

6. Почему некоторые данные для статистического анализа взяты в нативном виде, а некоторые прологарифмированы? Необходимо было обосновать и описать это в разделе «статистические методы».

7. В ряде случаев Т-тест проводился для логарифмированных значений. Т.е. изначально распределение, судя по всему, отличалось от нормального, его искусственно привели к нормальному. Почему тогда сразу не использовать критерий Манна-Уитни? По какому основанию логарифмировали значения? Эти подробности следовало бы описать в разделе «статистические методы».

8. Исследование структуры данных методом главных компонент. Для разделов 3.1 и 3.3 выделено две главных компоненты, характеризующие всего 56% и 53% общей дисперсии. Использовался ли метод Varimax для разделения факторов? Все ли переменные вошли в выделенные факторы? На каком основании принималось решение о значимости вклада признака в выделенный фактор? Рисунок 8 (стр. 65) непонятен. Что откладывалось по оси абсцисс и

ординат? Если факторные нагрузки (Factor loadings), то их надо было и указать. Таблицы 3, 6 – то же самое, если в них указаны факторные нагрузки, это необходимо было указать. Рисунок 18 – не указано, какие значения взяты для сравнения групп? Факторные веса (Factor scores)?

9. В работе присутствует ряд технических недочетов. Например, сокращений в оглавлении, с моей точки зрения, можно было избежать. Список литературы оформлен по старому ГОСТу. Есть ряд стилистических неточностей, например, «при ненормальном распределении..» лучше было заменить на «при распределении, отклоняющимся от нормального».

Указанные недостатки не имеют принципиального характера и не снижают научную ценность работы.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Галины Владимировны Концевой «Активация мукозального иммунитета легких неинфекционными стимулами» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по объему и значимости полученных результатов является законченной научно-квалификационной работой и посвящена решению актуальной научно-практической задачи – исследованию нейроэндокринного ответа и реакции мукозального иммунитета легких на хемосигналы самок и наночастицы, содержащиеся в мочевых метках самок, у мышей двух лабораторных линий, различающихся по типу иммунного ответа. Диссертация Концевой Г.В. соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям и п. 9 «О порядке присуждения ученых степеней» постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г. № 842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Зав. лабораторией
нейробиологии НИИ ББ ТГУ,
проф. каф. человека и животных
БИ ТГУ, д.б.н., доцент



М.Ю.Ходанович

