

УТВЕРЖДАЮ:

Проректор по научной работе

Санкт-Петербургского государственного
университета

Д.Х.и., профессор, С.П. Туник

2015 г.



ОТЗЫВ

ведущего учреждения о диссертационной работе Галины Владимировны Концевой «Активация мукозального иммунитета легких неинфекционными стимулами», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Актуальность темы диссертационной работы

Мукозальный иммунитет легких, представленный физическими барьерами, клеточными и гуморальными механизмами, играет важную роль в распознавании и элиминации потенциально опасных для организма патогенов. К настоящему времени механизмы защитного реагирования мукозального иммунитета легких на инфекционные стимулы хорошо изучены. Однако механизмы активации мукозального иммунитета легких в ответ на социальные стимулы, сопряженные с повышением риска возможных инфекций, в частности в процессе размножения, остаются практически неисследованными. Познание механизмов, ограничивающих внутрипопуляционное распространение инфекций, является одной из актуальных проблем современной биологии и медицины. Вместе с тем, механизмы участия феромонов в обеспечении повышения резистентности организма к бактериальным и вирусным инфекциям до сих пор остаются недостаточно исследованными и требуют новых методических подходов к решению основного вопроса, связанного с влияниями хемокоммуникативных сигналов на мобилизацию лейкоцитов в ткани легких. При ольфакторном исследовании запаховых меток ноздри мышей соприкасаются с субстратом, что приводит к попаданию на

поверхность слизистой носа субмикронных и наноразмерных частиц и высокомолекулярных белков. Если сигнальная роль содержащихся в моче белков семейства липокалинов активно исследуется, то значение твердых аэрозолей неорганической природы остается вне поля зрения ученых. Интерес к анализу их физиологических эффектов связан не только с решением проблем хемокоммуникации, но и с проблемами нанобиобезопасности, значимость которой определяется загрязнениями окружающей среды твердыми аэрозолями. Представленная работа посвящена углубленному изучению генетически детерминированных особенностей иммунного реагирования легких на неинфекционные стимулы, такие как половые хемосигналы самок и наночастицы, и безусловно является актуальной.

Достоверность и обоснованность научных результатов

Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа проиллюстрирована 11 таблицами и 26 рисунками. Библиографический указатель включает 205 источников, из них 7 – отечественных, 198 – зарубежных.

Диссертация написана хорошим литературным языком, почти не содержит опечаток. Рисунки и таблицы исчерпывающе иллюстрируют полученные данные. Основные результаты опубликованы в 4-х статьях в журналах, рекомендованных ВАК, и представлены на международных и российских конференциях, тезисы которых опубликованы (всего 11 публикаций).

Представленное исследование роли неинфекционных стимулов в активации мукозального иммунитета легких проведено на базе лаборатории экологической генетики млекопитающих ИЦиГ СО РАН. В ходе исследования по теме диссертационной работы проведено пять оригинальных экспериментов:

1. Исследование нейроэндокринного ответа и реакции мукозального иммунитета легких на интраназальную аппликацию мочи самок и бактериального липополисахарида у самцов мышей;
2. Изучение иммуноэндокринной реакции на интраназальное введение мочи самок и иммуногенных стимулов у самцов мышей, различающихся по типу иммунного ответа;
3. Анализ иммуноэндокринной реакции самцов на запах полового феромона (2,5-диметилпиразина) и мочи самок;

4. Оценка реакции мукозального иммунитета легких и эндокринного ответа на интраназальную аппликацию суспензии нано- и микроразмерных частиц Таркосила 25;
5. Изучение реакции мукозального иммунитета легких и эндокринного ответа на хроническую экспозицию в присутствии частиц Таркосила 25 у самцов мышей, различающихся по типу иммунного ответа.

Исследование выполнено на 58 аутбредных лабораторных мышах ICR, а также на двух инbredных линиях мышей – 101 мыши линии BALB/c и 92 мышах линии C57B1, характеризующихся преобладанием гуморального и клеточного иммунного ответа соответственно. В экспериментах по исследованию эффектов хемосигналов самцы мышей содержались изолированно от самок в комнатах с раздельной вентиляцией. Эксперименты 1 и 2 выполнены на конвенционных животных, эксперименты 3-5 на животных, свободных от видоспецифических патогенов (specific pathogen free - SPF) в условиях «SPF-вивария» ИЦиГ СО РАН. По окончанию экспериментов SPF-статус животных был подтвержден вирусологическими и бактериологическими исследованиями. В качестве неинфекционных стимулов использовали мочу самок мышей как натуральный источник хемосигналов и наночастицы диоксида кремния (Таркосил 25). Суспензию Таркосила 25 диспергировали ультразвуком, что позволило получать частицы размером менее 100 нм. Для подсчета лейкоцитов в тканях легких использовано гистологическое исследование тканевых препаратов с помощью системы анализа изображений, состоящей из микроскопа проходящего света, компьютера, цветной цифровой видеокамеры и соответствующей программы. Общее число лейкоцитов в бронхоальвеолярном лаваже, а также количество лейкоцитов в крови определяли на автоматическом гематологическом счетчике. Концентрацию цитокинов в гомогенатах тканей легкого и гипоталамуса, а также в супернатантах смывов легких, концентрацию тестостерона в плазме крови определяли иммуноферментными методами с помощью коммерческих наборов реагентов. Концентрацию кортикостерона в плазме крови анализировали с использованием радиоиммunoлогического метода. Пероксидазную активность бронхоальвеолярного лаважа определяли колориметрическим методом в реакции с тетраметилбензидином. Результаты исследования представлены как $M \pm SEM$. Для нормального распределения признаков использован одно- и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA), при ненормальном распределении использован тест Краскела-Уоллеса. Множественное сравнение средних проведено на основе критерия – least significant differences (LSD). Для оценки достоверности различий между двумя средними при нормальном распределении использован тест Стьюдента, при ненормальном распределении – тест Манна Уитни. Для

интеграции данных, отражающих комплексное реагирование отдельных систем организма на введение препаратов использован метод главных компонент.

Поставленные в данном исследовании цель и задачи четко сформулированы. Спектр методов, использованных в работе, очень широк и полностью адекватен поставленным задачам. Большой объем данных, их профессиональный анализ, использование корректных методов статистической обработки данных позволяют считать результаты диссертационной работы достоверными, а положения, выносимые на защиту, и выводы обоснованными.

Новизна полученных результатов, выводов, практических рекомендаций

Автором изучена роль хемосигналов самок мышей как сигналов о повышении инфекционных рисков, связанных с размножением, в активации мукозального иммунитета легких у самцов. В результате проведенного диссертационного исследования впервые показано, что хемосигналы самок вызывают мобилизацию лейкоцитов в легкие самцов лабораторных мышей уже через 2 часа после начала воздействия. Выявленный автором феномен имеет важное адаптационное значение: такая быстрая мобилизация иммунной защиты способна значительно снизить риск инфицирования при поиске полового партнера. Вскрытый механизм можно рассматривать в качестве нового примера сигнальной адаптации. Автором впервые установлено, что активация мукозального иммунитета легких в ответ на половые феромоны самок зависит от генотипа самцов и более выражена у животных с преобладанием Th2-типа иммунного ответа. В отличие от воздействия бактериального липополисахарида хемосигналы самок вызывают мобилизацию лейкоцитов в легкие без существенной активации провоспалительных цитокинов, в частности ИЛ-1 β , и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Автором впервые получены данные о влиянии генотипа животных на иммунный ответ на наночастицы оксида кремния: самцы мышей с преобладанием Th1- и Th2-типов иммунного ответа проявляют различные паттерны реагирования на интраназальную аппликацию наночастиц. У мышей линии BALB/c введение наночастиц вызывало активацию мукозального иммунитета легких, тогда как у мышей линии C57B1 повышалось количество лейкоцитов крови. При этом активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы выявлена у мышей обеих линий.

Полученные данные о влиянии запаховых сигналов на иммуноэндокринную функцию самцов мышей могут найти применение при регламентации норм содержания лабораторных животных, используемых в иммунологических исследованиях, а также при профилактике респираторных инфекций у животных. Данные о том, что животные с разным генотипом проявляют разную реакцию на неинфекционные стимулы, могут быть

использованы при выборе объекта для исследований в нанотоксикологии. В частности, в принятых в Российской Федерации нормативных документах по оценке безопасности наноматериалов (Приказ № 280 от 12.10.2007) рекомендовано проводить токсикологические испытания на мышах линии C57B1, которые по данным настоящей диссертации практически не реагируют на интраназальное введение наночастиц диоксида кремния. Полученные в диссертации данные будут полезны при разработке критериев индивидуальной восприимчивости рабочих к негативному влиянию наноразмерных аэрозолей производственной среды.

Значимость результатов для науки и практики

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы Г.В. Концевой состоит в том, что полученные результаты вносят вклад в понимание нейроиммunoэндокринологических механизмов мобилизации иммунной защиты в мукозальном слое легких под влиянием социальных сигналов, предупреждающих о повышении рисков инфицирования. Выявленное автором активирующее действие хемосигналов самок на мукозальный иммунитет легких без вовлечения провоспалительных цитокинов и стресс-реакции свидетельствует о перспективности применения феромонов для ограничения распространения инфекций при разведении грызунов в условиях вивария. Полученные сведения о влиянии наночастиц диоксида кремния на состояние мукозального иммунитета легких могут быть полезными при подборе персонализированного курса лечения, поиске и тестировании новых фармакологических препаратов, разрабатываемых для профилактики и лечения респираторных заболеваний. Выявленные автором отличия реакций на неинфекционные стимулы разной природы при совпадении их эффектов в отношении мобилизации лейкоцитов в легкие необходимо учитывать при тестировании препаратов, использующихся для активации мукозального иммунитета легких.

Недостатки и общие замечания по диссертационной работе

В ходе данного исследования автором было выявлено, что хемосигналы и наночастицы твердых аэрозолей, содержащиеся в мочевых метках самок мышей, являются значимыми сигнальными факторами для активации мукозального иммунитета и обеспечения тем самым защиты от инфекций. Влияние феромонов и наночастиц на мукозальный слой легких наблюдается у генетической линии мышей, для которой характерно преобладание Th2-типа иммунного ответа. Для линии с преобладанием Th1-типа иммунного ответа статистически значимого прироста количества клеток в бронхоальвеолярном лаваже не наблюдали. Различия в лейкоцитарной реакции на интраназальное введениеnano- и микрочастиц сочетались с неодинаковым содержанием

одного из ключевых факторов провоспалительной реакции – ФНО α . При этом впервые установлено, что наибольший эффект вызывают наночастицы и этот эффект имеет место только у мышей линии BALB/c. В отличие от иммунологических показателей бронхоальвеолярного лаважа лейкоциты крови демонстрируют статистически значимую реакцию на интраназальное введениеnano- и микрочастиц у мышей линии C57B1, у которых отмечено повышение относительного числа средних лейкоцитов и гранулоцитов. Выводы автора представляются правомочными, однако у рецензента возникает ряд вопросов и замечаний.

1. На основании собственных данных и литературных сведений автор может охарактеризовать популяции лейкоцитов, мигрирующие в мукозальный слой легких в течение 2-х часов после интраназальной аппликации мочи самок?
2. Каков, по мнению автора, механизм индукции миграции лейкоцитов в ткань легких и их мукозальный слой после интраназального введения мочи самок?
3. Известно, что миграция лимфоцитов в легочной системе осуществляется в двух направлениях – из кровеносных сосудов в интерстициальную ткань и в просвет альвеол и, наоборот, из просвета альвеол в ткань легких, лимфатическую систему и в кровеносные сосуды. В связи с этим не может ли отсутствие выраженного эффекта половых хемосигналов и наноразмерных твердых аэрозолей у мышей C57B1 означать усиление оттока лимфоцитов в кровеносное русло?
4. Какие механизмы опосредуют увеличение числа лейкоцитов в бронхоальвеолярном лаваже мышей линий BALB/c и C57B1, наблюдаемое после многодневной ингаляции наноразмерных частиц двуокиси кремния?

В качестве замечаний можно привести некоторые стилистические погрешности, например, «экспозиция запахом», отсутствие на диаграммах сведений о количестве животных в экспериментальной группе, недостаточно информативные подписи под некоторыми рисунками. В диссертационной работе автором сформулированы три задачи, а выводов – восемь. Обычно легче рецензировать работы, где количество задач совпадает с числом выводов. Однако сделанные замечания не влияют на высокую оценку работы в целом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационное исследование Галины Владимировны «Активация мукозального иммунитета легких неинфекционными стимулами» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой впервые получены сведения о том, что

хемосигналы и наночастицы твердых аэрозолей, содержащихся в мочевых метках самок мышей, являются значимыми сигнальными факторами для активации мукозального иммунитета. Результаты данного исследования позволяют расширить имеющиеся представления о молекулярно-клеточных механизмах, лежащих в основе выявленного нового примера сигнальной адаптации. Данные о том, что животные с различным генотипом проявляют разную реакцию на неинфекционные стимулы, представляются важными в связи с выбором объектов для исследований в иммунологии. Кроме того, полученные результаты будут полезны при разработке критериев индивидуальной восприимчивости рабочих к негативному влиянию наноразмерных частиц аэрозолей в производственных условиях. Результаты, полученные Г.В. Концевой, могут быть использованы в исследованиях, проводимых в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН, Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова и других учреждениях. Качество и количество публикаций соответствует требованиям, предъявляемым Высшей Аттестационной Комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации.

По актуальности проблемы, теоретической и практической значимости, оснащенности современными методами исследования, новизне и ценности полученных результатов диссертация Г.В. Концевой полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п.9 Постановления правительства РФ от 24.09.2013 г., № 842 «О порядке присуждения ученых степеней»), а ее автор Галина Владимировна Концевая заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Отзыв составлен кандидатом биологических наук, доцентом кафедры общей физиологии Р.И. Коваленко и кандидатом биологических наук, ассистентом кафедры общей физиологии А.А. Петенковой.

Отзыв заслушан и обсужден на заседании кафедры общей физиологии биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета (протокол №1 от 19.01.2015)

Заведующий кафедрой общей физиологии СПбГУ,
доктор биологических наук, профессор



А.Г. Марков