

«Утверждаю»

Проректор федерального
государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Ярославский
государственный медицинский
университет» Минздрава России

д.м.н., профессор

А.А. Баранов

2016г.

ОТЗЫВ

ведущей организации

ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-
практической ценности диссертационной работы Фальчука Евгения
Леонидовича «Изучение барьерных свойств фолликул-ассоциированного
эпителия Пейеровых бляшек тонкой кишки крысы», представленной на
соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.03.01 – физиология

Актуальность избранной диссертантом темы

Диссертационная работа Е.Л. Фальчука посвящена актуальной
проблеме современной физиологии - изучению проницаемости тканевых
барьеров организма и роли его отдельных элементов в регуляции
антигенного и ионного гомеостаза. В частности, целью данного
исследования является изучение барьерных свойств фолликул-
ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек - элементов лимфоидной

системы слизистой кишки. Пейеровы бляшки играют основную роль в инициации иммунного ответа по отношению к патогенным микроорганизмам и вирусам, и, одновременно, обеспечивают формирование толерантности к безвредным компонентам пищи и представителям кишечного микробиома. Для реализации данных функций важным этапом является захват и транспорт антигенных структур через фолликул-ассоциированный эпителий. В настоящее время хорошо описана функция специальных М-клеток фолликул-ассоциированного эпителия, в то время как свойства межклеточного барьера, и, следовательно, его роль в обеспечении транспорта патогенных структур, оставалась не изученной.

Подробное изучение молекулярных механизмов, обеспечивающих барьерные свойства фолликул-ассоциированного эпителия, является актуальной задачей физиологии. Кроме этого, изучение этого вопроса является необходимой основой для оценки роли нарушения целостности эпителиального барьера Пейеровых бляшек при развитии воспалительных заболеваний кишечника, таких как болезнь Крона, а также различных пищевых аллергий – процессов, этимология и молекулярные механизмы которых остаются не раскрытыми.

Представленные в работе результаты были неоднократно апробированы на конференциях Европейского сообщества по изучению транспорта в эпителии (EITG – European intestinal transport group), а также опубликованы в ведущем европейском физиологическом журнале «Acta Physiologica» и Вестнике СПбГУ, что подтверждает актуальность диссертационного исследования.

Научная новизна исследований

Впервые с использованием комплексного подхода, включавшего электрофизиологические и молекулярно-биологические методы, были

исследованы барьерные свойства фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек тощей кишки крысы. В результате получены новые данные о том, что для Пейеровых бляшек характерно большее трансэпителиальное, субэпителиальное и эпителиальное сопротивление по сравнению с эпителием ворсинок тощей кишки крысы. С использованием флуоресцентно меченых молекул декстрана впервые установлено, что эпителий Пейеровых бляшек характеризуется меньшей проницаемостью парацеллюлярного пути для макромолекул. Новыми и оригинальными являются данные о спектре белков плотных контактов фолликул-ассоциированного эпителия, а также о большем уровне клаудина-1, клаудина-5 и клаудина-8 – снижающих межклеточную проницаемость. К приоритетным знаниям относится сделанный на основе экспериментальных данных вывод о том, что снижение парацеллюлярной проницаемости способствует транспорту антигенных структур по трансцеллюлярному пути через специализированные М клетки.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Достоверность представленных результатов подтверждается применением сертифицированного научного оборудования, а также объемом выборки. В работе использованы адекватные статистические методов для оценки полученных результатов. При постановке экспериментальной части работы учитывались сведения из научной литературы и современные научные представления о функционировании эпителиальных барьеров. Для получения результатов использовались адекватные поставленным задачам методы исследования, которые включали как широко используемые молекулярно-биологические методы анализа – Вестерн блот и иммуногистохимическое определение локализации белков в ткани, так и профильные и узкоспециализированные

методы для изучения проницаемости ткани – метод регистрации тока короткого замыкания и метод импедансной спектроскопии.

Для полученных результатов характерно отсутствие внутреннего противоречия. Представленные в диссертационной работе выводы и научные положения полностью соответствуют результатам исследования.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы представлена полученными фундаментальными знаниями о проницаемости фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек, а также данными о наличии и уровне различных белков семейства клаудина. Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание о функционировании тканевых барьеров в организме, а также расширяют представление о механизмах транспорта антигенных структур из просвета кишки и роли парацеллюлярного барьера в данном процессе.

Практическая значимость диссертационного исследования связана с применением данных о барьерных свойствах фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек при разработке подходов для предупреждения аллергий и воспалительных заболеваний кишечника. Информация о распределении белков плотных контактов, регулирующий парацеллюлярный барьер, представляется важной для адресной доставки вакцин и лекарств в организм.

Объем и структура работы

Диссертация построена по классической схеме и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение, выводы и список

литературы из 269 источников. Работа изложена на 135 страницах, иллюстрирована 1-ой таблицей и 21-им рисунком.

В «Обзор литературы» автор дает представление о понятии тканевых барьеров, электрофизиологических методах исследования и представляет комплекс белков плотных контактов как основной элемент, определяющий проницаемость эпителиального слоя. Значительная часть «Обзора литературы» посвящена лимфоидной системе слизистой кишки, и в частности – имеющейся информации о транспорте антигенных структур через фолликул-ассоциированный эпителий. В завершении «Обзора литературы» автор суммирует имеющуюся информацию о барьерных свойствах фолликул-ассоциированного эпителия, что позволяет заключить о необходимости проведения комплексного анализа для изучения роли парацеллюлярного барьера фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек.

В разделе «Материалы и методы исследования» подробно описаны все этапы проведения диссертационного исследования. Особый акцент сделан на описании метода регистрации электрофизиологических параметров ткани на камере Уссинга, метода одноканальной импедансной спектроскопии и морфометрического анализа. Подробно указаны условия проведения Вестерн-блот анализа и иммуногистохимического определения локализации белков в ткани. Построение главы «Материалы и методы исследования» раскрывает общий план проведения исследования, этапы которого направлены на решение поставленных задач.

Результаты исследования представлены в трех главах, в которых описываются полученные и обработанные автором данные, а также имеется обсуждение полученных результатов с учетом данных из мировой литературы. В главе «Изучение электрофизиологических характеристик...» представлены данные о величине электрофизиологических параметров фолликул-ассоциированного

эпителия Пейеровых бляшек из различных сегментов тонкой кишки, а также проведен сравнительный анализ с полученными значениями для эпителия ворсинок тощей кишки. В отдельной главе «Изучение проницаемости...» представлены данные из экспериментов с флуоресцентно меченым декстраном, которые вместе с предыдущей главой оценивают барьерные свойства фолликул-ассоциированного эпителия на функциональном уровне и позволяют выделить роль парацеллюлярного пути как барьера для антигенных структур. Третья глава «*Результатов исследования*» содержит данные об особенностях функционирования комплекса плотных контактов фолликул-ассоциированного эпителия и ворсинчатого эпителия тощей кишки. Представленные в данной главе результаты о большем уровне клаудина-1, клаудина-5 и клаудина-8 объясняют представленные ранее данные о меньшей проницаемости фолликул-ассоциированного эпителия для ионов и макромолекул.

В «*Обсуждении*» автор проводит анализ собственных результатов с учетом информации из современной научной литературы, и в завершении формулирует представление о роли парацеллюлярного барьера фолликул-ассоциированного эпителия, основной задачей которого является ограничение проникновения патогенных структур в обход М клеток, а также предположение о том, что именно влияние иммунных клеток способствует гетерогенности барьерных свойств между фолликул-ассоциированным эпителием и эпителием ворсинок тощей кишки.

Замечания и вопросы

Учитывая выбранное направление работы – изучение функционирования иммунной системы слизистой оболочки кишки, можно было бы дать больший обзор по проблематике воспалительных

заболеваний кишечника и пищевых аллергий, развитие которых может начинаться именно в области Пейеровых бляшек.

Также хотелось бы задать несколько вопросов относительно изучения проницаемости с помощью макромолекул:

1. Известно, что существуют молекулы декстрана бóльшего размера, например, 70 кДа и 150 кДа. Почему они не были использованы в вашей работе?

2. В «Обзоре литературы» при описании роли клаудина-5 мыши, нокаутные по данному белку, погибают в течение нескольких часов после рождения. Может ли быть этому причиной потеря клаудина-5 не только в гематоэнцефалическом барьере, но также и в эпителии Пейеровых бляшек, где он, очевидно, играет важную роль в регуляции барьерных свойств.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Фальчука Евгения Леонидовича «Изучение барьерных свойств фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек тонкой кишки крысы» является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной задачи, имеющей существенное значение для физиологии пищеварения. Диссертация выполнена на современном уровне, обладает научной ценностью и практической значимостью.

Представленная к защите работа по своему содержанию, методологическому подходу, уровню и новизне представленных результатов соответствует требованиям пунктов 9-14, предъявляемым «Положением о порядке присуждения научных степеней» от 24.09.2013 г. №842, а ее автор заслуживает степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – «физиология».

Отзыв обсужден и утвержден на заседании кафедры нормальной физиологии с биофизикой ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Протокол № 1 от «20» сентября 2016 г.

Заведующий кафедрой нормальной физиологии

ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России,

доктор медицинских наук, профессор

Маслюков П.М.

Ученый секретарь ФГБОУ ВО ЯГМУ

Минздрава России, кандидат медицинских наук,

доцент

Потапов М.С.

150000, Ярославль, ул. Революционная, д. 5.

Тел. +7(4852) 30-56-41 e-mail: ysmu.ru@mail.ru