

Отзыв

официального оппонента на диссертацию

Вишневской Ольги Николаевны на тему «Проницаемость стенки тощей кишки крысы при воздействии холерного токсина и липополисахарида», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.03.01- физиология
03.03.04- клеточная биология, цитология, гистология

Изменение барьерной функции кишечника, во многом определяющееся его морфофункциональным состоянием и составом микробиоценоза, является одной из наиболее актуальных проблем современной биологии, медицины и ветеринарии. Клеточный состав кишечного эпителия, ультраструктура энтероцитов и эндотелиальных клеток, мультимолекулярный комплекс, состоящий из трансмембранных белков плотных контактов, обеспечивают быстрое реагирование организма на изменяющиеся эндогенные и экзогенные процессы. В настоящее время успехи, достигнутые при исследовании слизистой оболочки кишечника на ультраструктурном и молекулярном уровнях, позволяют оценить ее проницаемость для отдельных молекул и ионов, сложных веществ, компонентов микроорганизмов и даже возможность транслокации бактерий. Однако изменение барьерных функций кишечника после воздействия различных факторов остается недостаточно изученным.

В работе Вишневской О.Н. впервые проведено сравнительное исследование влияния экзотоксинов и эндотоксинов, продуцируемых грамотрицательными бактериями на проницаемость стенки кишечника при помощи комплекса методов и различных моделей. Были использованы две модельные системы: изолированный фрагмент тощей кишки крысы и поляризованные эпителиальные клетки тощей кишки новорожденного поросенка. Для работы были выбраны токсины наиболее актуальные при рассмотрении кишечной патологии: экзотоксин холерного вибриона (холероген) и компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий эндотоксин, липополисахарид. Исследуемые токсины значительно отличаются по механизму действия на слизистую оболочку кишки.

Влияние холерного токсина на клетки тонкой кишки за счет воздействия на G белок и активации аденилатциклазы достаточно хорошо известно, но оставалось неизученным его воздействие на уровень белков плотных контактов, определяющих проницаемость эпителия и степень морфологической деструкции.

Известно, что липополисахарид может оказывать токсическое действие на клетки организма, воздействуя на TLR4 рецепторы. Он активирует лейкоциты, эндотелиоциты, миоциты, индуцирует синтез провоспалительных цитокинов и

систему комплемента. Каскад реакций индуцированных липополисахаридом может приводить к септическому шоку и острой полиорганной недостаточности. Однако, очень важным вопросом при исследовании влияния липополисахарида является уточнение места применения данного токсина, так как вызванный им эффект зависит от его действия на апикальную или базальную сторону клеток эпителия.

Изучение клеточных и молекулярных механизмов действия холерного токсина и липополисахарида на проницаемости эпителия кишечника, представленное в данной работе, несомненно, являлось актуальной целью исследования.

Четко сформулировать цели и задачи работы помог автору тщательный анализ данных литературы. Применение комплексного подхода, включающего в себя молекулярно-биологические, иммунологические и электрофизиологические методы, электронную микроскопию, а также использование соответствующих статистических критериев, позволило получить объективные экспериментальные данные.

Впервые для исследования плотных контактов эпителия тощей кишки крысы и линии клеток IPEC-J2 был применен комплексный подход, включающий в себя молекулярно-биологические, электронно-микроскопические и электрофизиологические методы. Получены новые данные, свидетельствующие о том, что действие холерного токсина вызывает снижение барьерных свойств эпителия и увеличение парацеллюлярной проницаемости. К приоритетным и принципиально новым результатам стоит отнести данные о том, что липополисахарид при действии его на апикальную сторону мембраны вызывает усиление барьерных свойств эпителия. Впервые установлено, что при действии холерного токсина и липополисахарида происходит изменение уровня клаудинов, повышающих и снижающих проницаемость эпителия.

В представленной работе предложен комплексный подход в исследовании действия экзотоксинов и эндотоксинов на барьерные свойства эпителия кишки, который имеет существенное практическое значение, так как положено начало для разработки методом прогнозирования осложнений при «чрезмерном росте грамотрицательных бактерий» как проявлении дисбиоза и при развитии инфекционного процесса, обусловленного патогенными грамотрицательными бактериями, в частности возбудителями холеры. Полученные данные также имеют теоретическую значимость так как расширяют наше представление о патогенезе указанных синдромов и заболеваний. Особое значение практическое и теоретическое значение имеет исследование влияния на кишечника липополисахаридов. Несмотря на то что условия постановки экспериментов не позволяют представить влияние так называемого «малого воспаления» на

развитие сердечно-сосудистой патологии, сахарного диабета и метаболического синдрома, не оставляет сомнений важность контроля степени повреждения кишечного эпителия на этапах локальной инициации системных изменений в организме. Результаты исследования безусловно представляют огромный интерес для микробиологов, занимающихся изучением кишечного микробиоценоза, физиологов, морфологов, гастроэнтерологов, инфекционистов, ветеринаров студентов, получающих медицинское и ветеринарное образование. В работе выявлены новые механизмы влияния холерного токсина и липополисахаридов на проницаемость кишечника. Впервые показано, что при воздействии данных токсинов изменяется уровень содержания белков плотных контактов, определяющих проницаемость эпителия. Впервые при электронно-микроскопическом исследовании ультраструктуры энтероцитов тощей кишки крысы показано, что действие липополисахарида не приводит к визуально различимым деструктивным изменениям в энтероцитах перемещения различных ионов и воды, происходящем в случае воздействия холерного токсина. Показано, что холерный токсин вызывает мощную деструкцию эпителия тощей кишки, качественные и количественные изменения белков плотных контактов, вызывая снижение сопротивления клеток. Получены приоритетные данные о том, что холерный токсин снижает барьерные свойства эпителия и увеличивает парацеллюлярную проницаемость. К наиболее интересным и новым результатам стоит отнести данные о том, что липополисахарид при его действии на апикальную сторону мембраны вызывает усиление барьерных свойств эпителия.

Структура представленной работы является традиционной. Работа состоит из введения, обзора литературы, глав о материалах и методах, полученных результатах и их обсуждений, выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 109 страницах печатного текста, имеет 1 таблицу и иллюстрирована 30 рисунками. В списке цитируемой литературы приведено 178 источников.

Во введении автором представлена и проанализирована проблема, которую предстоит решить в диссертации. На основании данного анализа сформулированы цель и задачи исследования. Обоснованы новизна, теоретическое и практическое значение работы.

Первая глава посвящена анализу литературы. В обзоре наиболее полно отражены данные о клеточном составе эпителия тонкой кишки, белках плотных контактов (цитоплазматических белках, клаудинах, окклюдинах, адгезионных белках JAMs и трицеллюлине), механизмах трансцеллюлярного и парацеллюлярного транспорта ионов и химических соединений. Также в обзоре подробно описаны механизмы действия экзотоксина холерного вибриона и липополисахарида. В обзоре приводится информация об использовании

клеточных линий в качестве модельных объектов исследования влияния различных факторов на кишечный эпителий.

Обзор был бы еще более информативным при углубленном анализе литературы, касающейся представителей микробиоценоза кишечника, патогенных микроорганизмов, пробиотиков, их метаболитов, сигнальных молекул, оказывающих влияние на барьерные функции кишечного эпителия.

Вторая глава содержит обоснование и описание материалов и методов исследования. Для решения поставленных в диссертации целей и задач использованы электрофизиологические, молекулярно-биологические и электронно-микроскопические методы. Уникальность работы обусловлена использованием автором одновременно нескольких методов для оценки барьерных функций эпителия. Особенно следует подчеркнуть важность трудоемкого и сложного, но весьма информативного метода электронной микроскопии ультратонких срезов фрагментов тощей кишки крыс. Также существенно выиграла работа благодаря оценке содержания белков плотных контактов. Методом Вестерн-блот с использованием моноклональных антител (MoViТес, Германия) было определено содержание белков плотных контактов: порообразующих клаудинов (12,-7,-8) и клаудинов, снижающих плотность эпителия (-1 и -4. -8) в мембранных фракциях клеток стенки тощей кишки и культуры ИРЕС-J2.

Высокий методический уровень работы, сочетание классических и ультрасовременных методов исследования, использование сертифицированного экспериментального оборудования и программного обеспечения, достаточный объем выборки, с использованием соответствующих статистических методов позволяют не сомневаться в достоверности и качестве полученных результатов.

Третья глава включает в себя описание проведенного электрофизиологического исследования тощей кишки крысы и линии клеток ИРЕС-J2 при действии холерного токсина и липополисахарида. Полученные результаты свидетельствуют, что действие холерного токсина на апикальную сторону эпителия приводит к достоверному снижению трансэпителиального сопротивления и увеличению проницаемости для молекул флуоресцеина натрия. Воздействие липополисахарида не вызывало изменения трансэпителиального сопротивления и проницаемости.

В четвертой главе описано подробное исследование ультраструктуры эпителия тощей кишки при воздействии холерного токсина и липополисахарида. Показано различное влияние исследуемых токсинов на площадь межклеточного пространства и плотность микроворсинок на апикальной поверхности клеток.

Пятая глава посвящена изучению уровня содержания клаудинов в эпителии тощей кишки и линии клеток ИРЕС-J2 под воздействием исследуемых токсинов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при действии холерного токсина и липополисахарида происходит изменение уровня экспрессии этих белков, способных повышать и снижать проницаемость эпителия.

Применение холерного токсина приводило к увеличению уровня содержания порообразующих белков плотных контактов клаудинов-2,-7 и снижение барьерного клаудина-8 в эпителии тощей кишки крыс по сравнению с контролем. После воздействия липополисахарида были выявлены клаудины клаудины, компенсирующие действие друг друга (- 2 и -4). На культуре клеток после воздействия анализируемых токсинов, уровень содержания пороформирующего клаудина (-7) становился меньше, чем в контроле.

Обсуждение полученных результатов проведено с использованием современных статей и гипотез по данной проблематике. В результате этого автор квалифицированно обсуждает полученные результаты и выдвигает обоснование гипотезы о действии бактериальных токсинов на кишечный эпителий, которое может в ряде случаев приводить к транслокации бактерий. Получены новые данные, свидетельствующие о том, что действие холерного токсина вызывает снижение барьерных свойств эпителия и увеличение парацеллюлярной проницаемости. Липополисахарид при действии его на апикальную сторону мембраны вызывает усиление барьерных свойств эпителия.

Выводы отражают содержание работы и соответствуют полученным в исследовании результатам.

Замечания по диссертации. Замечаний, существенно влияющих на содержание и выводы работы, нет. Возможно, стоит пересмотреть форму подписей к нескольким рисункам и исправить некоторые стилистические неточности и опечатки. Также неудачным является термин «уровень» клаудинов.

Есть несколько вопросов по диссертации.

Каков предполагаемый механизм действия холерного токсина на плотные контакты?

Как можно объяснить снижение количества пороформирующего клаудина -7 после воздействие холерного токсина и липополисахарида на культуре клеток?

Какое медицинское или общебиологическое значение имеет увеличение липополисахаридов в крови и в содержимом кишечника?

Заключение. Диссертация Вишневской Ольги Николаевны на тему «Проницаемость стенки тощей кишки крысы при воздействии холерного токсина и липополисахарида», выполненная под руководством двух научных руководителей: д.б.н. проф. А.Г. Маркова и д.б.н. доцента О.В. Рыбальченко, а также консультанта, Ашенбах Йорга, доктора медицинских наук, профессора, директора института ветеринарной физиологии Свободного университета Берлина, является самостоятельно выполненной научной работой, в которой

содержится новое решение актуальной научной задачи – изучение барьерных свойств кишечного эпителия под влиянием токсинов, на примере липополисахарида - эндотоксина, являющегося обязательным компонентом всех грамотрицательных бактерий, холерогена – ключевого экзотоксина, возбудителя особо опасной инфекции холеры. Полученные данные вносят новый вклад в понимание механизмов влияния микроорганизмов на эпителий слизистой оболочки кишки, взаимодействуя с мембранами клетки хозяина, участвуя в его метаболизме и осуществляя транслокацию, что важно для оценки влияния состава микробиоты на функционирование желудочно-кишечного тракта и вслед за этим практически на все системы организма.

По своей приоритетности, актуальности, объему проведенных исследований, новизне и практической значимости работа соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013г. № 842 (редакция от 21.04.2016 г. № 335) предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор, Вишневская Ольга Николаевна, достойна присуждения искомой степени по специальностям 03.03.01 – физиология и 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Ермоленко Елена Игоревна
доктор медицинских наук,
заведующая лабораторией биомедицинской
микрoэкологии, отдела молекулярной
микробиологии Федерального государственного
бюджетного научного учреждения «Институт
экспериментальной медицины», 197376, г.
Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова д.12,
7(812)2340542, lermolenko1@yandex.ru

Подпись Ермоленко Е.И.
заверяю.



Ученый секретарь

Д.Б.Н. Пшенкина Н.И.
20 09 2018 г.