

Григорьев
11.04

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Вишневской Ольги Николаевны

«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

Актуальность работы. Исследование действия экзо- и эндотоксинов на барьерную функцию кишечного эпителия представляет большой теоретический интерес в плане получения новых знаний о механизмах влияния микроорганизмов на слизистую оболочку кишечника, что в итоге может также способствовать решению проблемы механизмов транслокации бактерий через тканевые барьеры. Практическое значение результатов данного исследования определяется, например тем, что они могут использоваться в гастроэнтерологии при разработке новых подходов, направленных на предупреждение бактериальных инвазий через желудочно-кишечный тракт.

Детальный анализ литературы по рассматриваемой проблеме позволил диссертанту чётко сформулировать цель данной работы: исследование барьерных свойств эпителия тощей кишки крысы и монослоя клеток линии IPEC-J2 и ультраструктурных изменений энтероцитов тощей кишки при действии холерного токсина и липополисахарида.

Не вызывает сомнения научная новизна результатов, полученных в работе О.Н. Вишневской. Используя электрофизиологические методы, она впервые показала более значимое, по сравнению с липополисахаридом, неблагоприятное влияние холерного токсина на межклеточное сопротивление и проницаемость эпителия тонкой кишки крыс и монослоя клеток IPEC-J2. При этих условиях диссертантом впервые с использованием молекулярных методов были показаны изменения в содержании ряда белков плотных контактов (клаудины), что позволило выявить молекулярные механизмы наблюдаемых изменений. Продемонстрированы изменения в ультраструктуре эпителия тонкой кишки (увеличение межклеточного пространства между энтероцитами, снижение числа микроворсинок) под влиянием холерного токсина, но не липополисахарида. В случае применения липополисахарида наблюдалось появление везикул в цитоплазме энтероцитов и тучных клеток, локализованных в подслизистой основе тощей кишки.

Диссертационная работа изложена на 109 страницах печатного текста, содержит 1 таблицу и иллюстрирована 30 рисунками. Работа построена по традиционной схеме:

введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение, выводы, список литературы. Обзор литературы (объёмом 41 стр.) написан с привлечением 178 источников и содержит современные сведения о клеточном составе эпителия, видах транспорта веществ в эпителии, строении и составе плотных контактов, клеточных культурах для изучения транспорта ионов и других веществ, микробиоте желудочно-кишечного тракта.

Раздел «Материалы и методы» (29 стр.) дает достаточно полное и четкое представление о подготовке и обработке экспериментального материала, особенностях проведения электрофизиологических исследований на тонкой кишке крыс и монослое клеток IPEC-J2 с использованием камеры Уссинга и электронно-микроскопического анализа ультраструктуры кишечного эпителия, об определении содержания белков плотных контактов методом Вестерн-блот и о методах статистической обработки данных.

Основные результаты исследования изложены в трёх главах диссертации (21 стр.). Каждая глава содержит соответствующие гистограммы, графики и электронограммы. В первой из этих глав приведены результаты электрофизиологического исследования препаратов тощей кишки крысы и монослоя клеток линии IPEC-J2 (значения трансэпителиального сопротивления и проницаемости эпителия) в присутствии с апикальной стороны холерного токсина или липополисахарида, а также в контроле. Данные, представленные в этой главе, позволили сделать вывод о более значимых изменениях в барьерной функции эпителия тощей кишки и монослоя клеток линии IPEC-J2 после воздействия холерного токсина по сравнению с липополисахаридом. Во второй главе описаны результаты, полученные с использованием электронно-микроскопического метода, в отношении изменения ультраструктуры эпителия тощей кишки после воздействия холерного токсина и липополисахарида. Показаны изменения под влиянием холерного токсина (но не липополисахарида) таких параметров, как межклеточное пространство, количество микроворсинок на апикальной поверхности клеток и количество митохондрий в клетках. В третьей главе приведены данные об изменении содержания клаудинов в плотных контактах эпителия тощей кишки крысы и монослоя клеток линии IPEC-J2 под воздействием холерного токсина и липополисахарида. Исследованы различные клаудины, оказывающие как повышающее, так и снижающее влияние на проницаемость плотных контактов в изученных эпителиях. Показано, что холерный токсин, в отличие от липополисахарида, оказывает более сильное действие на содержание анализируемых клаудинов в плотных контактах эпителия тощей кишки. Этот факт раскрывает молекулярные механизмы, лежащие в основе негативного влияния холерного токсина на барьерную функцию кишечного эпителия.

В главе «Обсуждение» представлены обсуждение и анализ наиболее важных результатов работы в сопоставлении с данными современной литературы.

Выводы, сделанные соискателем, полностью соответствуют задачам исследования, документально обоснованы, логично вытекают из обсуждения и не вызывают возражений.

Принципиальных замечаний к рецензируемой работе нет. Однако, имеются некоторые недостатки в виде неточных или неудачных формулировок, что, впрочем, не влияют на положительную в целом оценку представленной работы. В качестве дискуссии предлагаю автору ответить на несколько вопросов по методике и по сути работы:

1. Какова молекулярная масса флуоресцеина натрия (маркер парацеллюлярной проницаемости) и как размер молекулы этого вещества соотносится с размером спонтанно образующихся пор в апикальной мембране энтероцитов ?

2. Как классифицируются различные эпителии в отношении их проницаемости для воды и способности транспортировать ионы? К каким классам относятся эпителии тонкой и толстой кишки?

Основные материалы диссертации полностью отражены в 8 научных публикациях, включающих 3 статьи в рецензируемых изданиях.

Диссертация Вишневской Ольги Николаевны на тему «Проницаемость стенки тощей кишки крысы при воздействии холерного токсина и липополисахарида» представляет собой законченную научно-исследовательскую работу в области физиологии эпителиев и молекулярных детерминант тканевых барьеров.

По 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.

Официальный оппонент,

Громова Людмила Викторовна, д.б.н.,

заведующий лабораторией физиологии питания

ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова

Российской Академии Наук»,

199034, Санкт-Петербург, набережная Макарова, д.6

Тел: (+7)911-262-60-36. E-mail: gromovalv@infran.ru

21.09.2018 г.



Громова Л.В.
21.09.2018
[Signature]