



L. PASTEUR

Федеральное бюджетное учреждение науки  
**«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ  
им. ПАСТЕРА»**

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека  
**(ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии  
имени Пастера)**

Мира ул., д. 14, Санкт-Петербург, 197101

Тел.: (812) 233-20-92. Факс: (812) 232-92-17

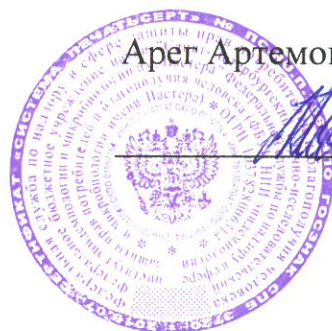
E-mail: [pasteur@pasteurorg.ru](mailto:pasteur@pasteurorg.ru)

<http://pasteurorg.ru>

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Директор института  
академик РАН,  
д.м.н., профессор

Арег Артемович Тотолян



№ 672 от 21.09.2018.

## ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности диссертации

**Вишневской Ольги Николаевны**

на тему «Проницаемость стенки тощей кишки крысы при воздействии  
холерного токсина и липополисахарида»

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальностям: 03.03.01 - физиология,

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

### Актуальность избранной темы

Барьерная функция эпителия является ключевой при развитии воспалительных заболеваний кишечника, при этом нормальное функционирование эпителия требует постоянного поддержания баланса между реактивностью и толерантностью к микроорганизмам тканей просвета кишечника. Изменение барьерных функций влечет за собой изменение свойств эпителия, а именно нарушение проницаемости для воды, ионов и, в конечном итоге, может привести к транслокации бактерий из просвета кишки в лимфу и системный кровоток. При хронических заболеваниях и при дисбактериозе кишечника условно-патогенные микроорганизмы, колонизируя слизистые оболочки, образуют биопленки, которые могут стать источником распространения бактерий и их токсинов по всему организму. Выживание микроорганизмов зависит от физиологической активности секретлируемых бактериями соединений, например, различных экзотоксинов

(холерный токсин), а при биопленкообразовании или разрушении клеток грамотрицательных бактерий – эндотоксинов, включающих фрагменты собственных клеточных стенок (липолисахарид /ЛПС/).

Избирательная проницаемость эпителия кишечника напрямую зависит от молекулярного состава белков плотных контактов и уровня содержания в них различных клаудинов. Взаимодействия белков плотных контактов с бактериальными токсинами (например, с ЛПС или холерным токсином) могут вызывать изменения в составе и локализации молекулярных компонентов кишечного эпителия. А при нарушении структуры эпителиального пласта происходит транслокация бактерий в ткани организма-хозяина.

Таким образом, тема диссертационной работы, а именно изучение роли тканевых барьеров в осуществлении механизма транслокации бактериальных токсинов и самих бактерий из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в лимфу и системный кровоток, является актуальной проблемой современных исследований.

#### **Связь работы с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства**

Данная работа была запланирована и проведена в рамках гранта РФФИ № 15-04-07464-а (2015-2017): «Влияние липополисахаридов на барьерные свойства эпителия и транслокацию пробиотических бактерий *Escherichia coli* M17 и *Lactobacillus plantarum* 8PA3 в тонкой кишке крысы» и гранта РФФИ № 16-04-01661-а (2016-2018): «Изучение механизмов регуляции проницаемости фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек кишки крысы».

#### **Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Автором получены принципиально новые данные: они представляют собой комплексное исследование, включающее в себя электронно-микроскопический анализ плотных контактов эпителиоцитов с одновременным сравнением данных молекулярно-биологического исследования уровня содержания клаудинов при воздействии холерного токсина и ЛПС.

Благодаря применению комплексного методологического подхода получены результаты, обладающие несомненной научной новизной. К важным и принципиально новым результатам следует отнести данные о действии ЛПС с апикальной стороны эпителиальных клеток. Впервые при

электронно-микроскопическом исследовании ультраструктуры энтероцитов тощей кишки крыс показано, что действие ЛПС не приводит к визуальным деструктивным изменениям в клетках. В отличие от холерного токсина ЛПС не вызывает изменения объема межклеточного пространства, являющегося отражением перемещения различных ионов и воды. В работе получены новые данные об изменении уровня клаудинов при действии исследуемых токсинов, а именно клаудина-2,-7 и клаудина-4,-8 повышающих и снижающих проницаемость эпителия соответственно.

### **Значимость для науки и производства (практики) полученных автором диссертации результатов**

Значимость работы заключается в изучении действия бактериальных токсинов на молекулярные детерминанты, обеспечивающие парацеллюлярную проницаемость эпителия кишечника. Исследование проведено на двух объектах: на ткани тощей кишки крысы и линии клеток ИРЕС-J2, что позволяет оценить влияние холерного токсина и ЛПС на тканевом и клеточном уровнях. Полученные результаты создают возможность для прогнозирования состояния эпителия, измененные барьерные функции которого могут повлечь за собой трансформацию его свойств, проявляющуюся в нарушении проницаемости для воды, ионов, и, в конечном итоге, могут привести к неконтролируемой транслокации бактерий из свойственного им биотопа в кровь и лимфу.

В работе показано, что эффект токсинов проявлялся в очень короткое время 20-90 мин. В связи с этим полученные в работе результаты создают предпосылки для нового научного направления – поиска эффективных антидотов, способных ингибировать действие токсинов, в том числе с использованием модели клеток линии ИРЕС-J2.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Оригинальные данные и разработанные подходы к изучению барьерных свойств эпителия, полученные при действии холерного токсина и липополисахарида, основанные на анализе трансэпителиального сопротивления энтероцитов в динамике, позволят получить первичную характеристику транспортных свойств эпителия и дать первоначальную оценку вклада и степени влияния различных токсинов на барьерные свойства. Также впервые полученная информация об изменении содержания белков плотных контактов при действии холерного токсина и липополисахарида может быть рекомендована в качестве основы для установления локализации и распределения белков окклюдина, клаудина-1, -

2, -3, -4, -5, -7, и -12 при воздействии различных токсинов. Все описанные в диссертации подходы и методы могут быть использованы при комплексном исследовании барьерных свойств эпителия при воздействии различных типов токсинов с целью изучения их действия на молекулярные детерминанты, обеспечивающие парацеллюлярную проницаемость эпителия кишечника. Используемые методические приемы оценки барьерной функции эпителия и полученные результаты позволяют предложить способ по скринингу влияния бактериальных токсинов на барьерные свойства эпителия кишки и транслокации бактерий через стенку кишечника. Материалы диссертации используют в учебном процессе в курсе «Микробиология, вирусология и иммунология» и курсе «Спецглавы по физиологии» в ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет».

#### **Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений**

Впервые проведенное автором комплексное исследование воздействия холерного токсина и липополисахарида позволило установить различие в характере изменения барьерных свойств, происходящих в эпителии тощей кишки при контакте с экзотоксином и эндотоксином. Используемые Вишневской О.Н. методы решения поставленных в диссертационном исследовании задач являются корректными и современными. 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 при электронно-микроскопическом исследовании ультраструктуры энтероцитов тощей кишки крысы показано, что действие липополисахарида не приводит к визуально различимым деструктивным изменениям в энтероцитах, например, к изменению объема, что является характерным отражением трансэпителиального перемещения различных ионов и воды, происходящем в случае воздействия холерного токсина. Впервые автором установлено, что при действии холерного токсина и липополисахарида происходит изменение уровня клаудинов, повышающих и снижающих проницаемость эпителия.

Выводы по диссертационному исследованию соответствуют поставленным цели и задачам, результаты работы являются достоверными и статистически значимыми.

### **Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, глав о методических приемах, экспериментальных исследованиях и их обсуждениях, 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.

Все поставленные автором задачи выполнены в полном объеме.

Замечаний, имеющих существенное значение, по диссертации нет. Некоторые неточные формулировки в тексте не влияют принципиально на содержание работы.

### **Соответствие автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации.

### **Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати**

По теме диссертационной работы опубликовано 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России и 10 тезисов докладов на конференциях. В публикациях содержится полный объем информации, касающейся темы диссертации.

### **Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней по пунктам:**

10) Диссертация написана автором самостоятельно, обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты. Данные, изложенные в диссертационной работе, получены лично автором. Соавторы указаны в соответствующих статьях и тезисах.

11) Основные научные результаты диссертации опубликованы в трех рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК.

14) При использовании методик или полученных ранее отдельных результатов автор диссертации ссылается на автора и источник заимствования материалов.

Имеются ряд вопросов по диссертации:

- 1) В работе исследовано 5 белков из семейства клаудинов и показано изменение уровня содержания 4-х из них под воздействием токсинов. Свидетельствует ли это о достоверном влиянии токсинов на все известные белки-клаудины?
- 2) В связи с чем выбраны именно такие дозы токсинов? Есть ли данные о дозозависимом эффекте токсинов на используемых моделях?
- 3) Свидетельствуют ли полученные данные электронно-микроскопического исследования о необратимом воздействии тестируемых доз токсинов на клетки эпителия тощей кишки крыс и культуры клеток IPES-J2?

#### **Заключение:**

Диссертация Вишневецкой Ольги Николаевны на тему «Проницаемость стенки тощей кишки крысы при воздействии холерного токсина и липополисахарида», выполненная под руководством доктора биологических наук, профессора Маркова Александра Георгиевича и доктора биологических наук, доцента Рыбальченко Оксаны Владимировны, а также при консультации с доктором медицинских наук, профессором Ашенбах Йоргом, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.03.01 - физиология, 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи - изучение роли тканевых барьеров в осуществлении механизма транслокации бактериальных токсинов и самих бактерий из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в лимфу и системный кровоток, имеющей существенное значение для физиологии, клеточной биологии, цитологии, гистологии (биологические науки) согласно паспорту специальностей: 03.03.01 в соответствии с п. 6 «Изучение механизмов функционирования клеток, тканей, органов, принципов их системной организации», и 03.03.04 в соответствии с п. 5 «Исследование адаптации тканевых элементов к действию различных биологических, физических, химических и других факторов», что соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., с изменениями, утвержденными постановлением Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям, а ее автор

заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.03.01 - физиология, 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании ученого совета  
«20» сентября 2018 г., протокол № Р.

Рецензенты:

Руководитель испытательного лабораторного центра,  
ведущий научный сотрудник  
ФБУН НИИ эпидемиологии  
и микробиологии имени Пастера  
доктор биологических наук

Афиногенова Анна Геннадьевна

Заведующая лабораторией медицинской бактериологии,  
ведущий научный сотрудник  
ФБУН НИИ эпидемиологии  
и микробиологии имени Пастера  
доктор медицинских наук

Краева Людмила Александровна

Подписи Афиногеновой Анны Геннадьевны  
и Краевой Людмилы Александровны заверяю:

Начальник отдела кадров

21.09.2018



Михайлова С.Н.