

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата медицинских наук Кутиной Анны Вячеславовны
на диссертационную работу Федоровой Арины Александровны
«Регуляция уабаином барьерной функции эпителия тощей и толстой кишки крысы
и монослоя линии клеток IPEC-J2»,
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных

Актуальность темы выполненной работы. Научная проблема, которой посвящена диссертационная работа - изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе проницаемости тканевых барьеров различных органов, а также способов ее регуляции. Эпителий кишечника является важным тканевым барьером, который обеспечивает транспорт ионов и низкомолекулярных органических веществ. Трансцеллюлярный транспорт ионов и органических молекул, в основе которого лежит активность Na,K -АТФазы, и межклеточный транспорт, определяемый белками плотных контактов, сопряжены между собой и обеспечивают осуществление функций эпителия. Поэтому изучение функционального взаимодействия Na,K -АТФазы и белков плотных контактов является важной задачей в понимании механизмов регуляции функций тканевого барьера. Исследование гормон-подобных соединений, инкретинов, аутакоидов в регуляции эпителиального транспорта – динамично развивающееся направление современной физиологии. Представляется актуальной поставленная в работе задача изучения роли уабаина (эндогенный модулятор активности Na,K -АТФазы) в регуляции барьерных функций кишки, поскольку в настоящее время кроме немногочисленных работ на клеточных культурах данных об изменении белков плотных контактов и проницаемости эпителия кишки при повышении концентрации уабаина в системном кровотоке животных нет. Не менее важным является исследование механизмов предотвращения и восстановления свойств тканевых барьеров в условиях патологии, в связи с чем, представляются актуальными задачи диссертационной работы по изучению эффектов уабаина в модели липополисахарид-индуцированного нарушения функций эпителия.

Достоверность и обоснованность положений, результатов и выводов диссертации обеспечивается применением в работе разнообразных и адекватных поставленным задачам электрофизиологических и молекулярно-биологических методов. Количество проведенных экспериментов, корректный дизайн исследования и применение адекватной и грамотно выполненной статистической обработки являются основанием достоверности полученных результатов. Основные результаты исследования Федоровой А.А. прошли этапы независимой экспертизы при грантовой поддержке исследований, представлении докладов по теме диссертации на конференциях и при публикации в ведущих российских и международных рецензируемых журналах (Q1-Q2 квартилей), что говорит о высокой оценке выполненной работы мировым научным сообществом. Выводы, сделанные диссидентом, полностью обоснованы и отражают полученные результаты.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Впервые было показано, что уабайн в клеточной линии IPEC-J2 увеличивает уровень клаудина-1 и -5, активируя cSrc-киназу. Проведенное исследование *in vivo* впервые

установило, что кардиотонический стероид уабаин является фактором регуляции барьерных свойств эпителия в тонкой и толстой кишке, изменяя уровни белков плотных контактов, которые обеспечивают избирательный вклад в межклеточную проницаемость. Получены приоритетные данные о том, что уабаин в физиологическом диапазоне концентраций в крови сегмент-специфически воздействует на барьерные свойства тощей и толстой кишки крысы, уменьшая уровень клаудина-2 и 8 в тощей кишке и увеличивая уровень клаудина-1 в толстой кишке. Повышение концентрации уабаина в плазме крови животных оказывает протективное действие против липополисахарид-индуцированного нарушения барьерных свойств эпителия (изменяет величину тока «короткого замыкания», препятствует изменению основных морфометрических показателей эпителия сегментов кишки, нивелирует рост межклеточной проницаемости), предотвращая снижение уровня белков плотных контактов (клаудина-1, -3, -8 и трицепллюлина), и увеличивая уровень клаудина-2 в эпителии тощей и толстой кишки.

Теоретическая значимость работы состоит в том, что проведенное исследование вносит вклад в решение фундаментальной задачи физиологии – изучение молекулярных основ и механизмов регуляции свойств тканевых барьера. Выявленные изменения уровня белков плотных контактов в эпителии кишки при действии лиганда Na,K -АТФазы уабаина свидетельствуют о возможном функциональном взаимодействии этих молекулярных комплексов и указывают на важность дальнейшего изучения взаимосвязи процессов трансцеллюлярного и параселлюлярного транспорта в эпителиях.

Практическая значимость работы состоит в том, что выявленное функциональное взаимодействие Na,K -АТФазы с белками плотных контактов в эпителии кишки и регуляторное влияние уабаина на барьерные свойства кишечного эпителия открывает путь к поиску и разработке новых соединений для предупреждения и лечения функциональных расстройств и заболеваний кишечника, в том числе воспалительного генеза.

Общая оценка структуры и содержания диссертации. Диссертационная работа А.А. Федоровой построена по традиционному плану и включает введение, список сокращений, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты, обсуждение результатов, выводы. Текст диссертации изложен на 128 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы и 21 рисунок. Список литературы включает 270 источников.

Во введении А.А. Федорова обосновывает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, достоверность полученных результатов, описывает биологические объекты и методы, использованные в работе, формулирует положения, выносимые на защиту, указывает свой личный вклад в выполнение исследования, приводит данные об апробации результатов работы, о научно-исследовательских стажировках и проектах, в рамках финансирования которых была выполнена работа.

Обзор литературы состоит из семи подразделов. Федорова А.А. дает в обзоре современное представление о тканевых барьерах и о строении и функции плотных контактов. Подробно разбирает имеющиеся в литературе данные о синергизме движения ионов через эпителиальные барьеры, о направленности транспорта и о взаимодействии клаудинов (основных белков плотных контактов) и Na/K -АТФазы, обеспечивающих параселлюлярный и трансцеллюлярный транспорт. Отдельный

раздел посвящен уабаину и его роли в гуморальной регуляции различных процессов в организме, систематизированы разрозненные экспериментальные данные разных авторов об эффектах уабаина на барьерные свойства эпителиев. Последний раздел обзора литературы посвящен описанию нарушений барьерных свойств кишечного эпителия. Указаны пробелы в существующих представлениях о взаимосвязи трансцеллюлярного и парациеллюлярного транспорта в эпителии, влиянии уабаина на барьерные свойства эпителия *in vivo*, сигнальной роли Na/K-АТФазы в регуляции функционального состояния комплексов плотных контактов. Показана важность научных задач, решаемых в ходе выполнения представленной диссертационной работы.

Дизайн и методы исследования соответствуют мировому уровню и описаны подробно. Исследование проведено на моделях различной сложности: клеточная линия IPEC-J2 и разные сегменты кишки крысы, сопоставлены данные полученные *in vitro* и *in vivo*. Федоровой А.А. в работе применен комплексный подход, включающий электрофизиологический метод и измерение межклеточной проницаемости для флуоресцентного зонда, световую микроскопию, Вестерн blot для оценки изменений в уровне белков плотных контактов, а также белков внутриклеточного сигналинга, иммуногистохимические методы с последующей визуализацией сигнала на конфокальном микроскопе для оценки локализации белков, статистические методы анализа. Все методы являются современными и полностью адекватны поставленным задачам.

Результаты работы изложены в двух главах. Первая посвящена изучению барьерных свойств клеточной линии IPEC-J2 при действии липополисахарида в условиях длительного применения уабаина, вторая - барьерным свойствам тощей и толстой кишки крысы при действии липополисахарида в условиях 4-х дневного применения уабаина. Обсуждение результатов вынесено в отдельный раздел, в котором содержится обобщение всех полученных данных, сформулирован ряд гипотез о возможных молекулярных механизмах функционального сопряжения Na,K-АТФазы и комплекса белков плотных контактов, в том числе при участии киназы Src.

Работа оформлена аккуратно, написана грамотно, хорошим научным языком, легко читается. Рисунки выполнены тщательно. Замечаний к работе и представлению результатов нет.

Выводы и положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют полученным результатам. В автореферате изложены все основные результаты диссертационной работы. Автореферат хорошо оформлен, однако шрифт на некоторых рисунках (рис. 3, 5) очень мелкий (в диссертации рисунки крупнее).

По результатам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных базах данных, что отвечает требованиям ВАК к публикации основных научных результатов диссертации. Содержание работы обсуждено на шести конференциях (98-ый Съезд немецкого физиологического общества (г. Ульм, Германия) 2019, XXIII Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова 2017, Международная медико-биологическая научная конференция молодых ученых «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» 2019 и 2022, Национальная конференция по естественным и гуманитарным наукам с международным участием «Наука СПбГУ – 2020», XXV Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2019»).

В ходе анализа диссертаций возникли вопросы, которые носят исключительно дискуссионный характер:

1. Можно ли рассматривать многократное введение уабаина в представленной работе как модель какого-то физиологического или патологического состояния?
 2. В работе показано протективное действие уабаина на эффекты липополисахарида при предварительном введении стероида. Можно ли рассчитывать на терапевтический эффект уабаина при уже существующем липополисахарид-индуцированном повреждении эпителия кишки?

Заключение

Диссертационная работа Федоровой А.А. «Регуляция уабаином барьерной функции эпителия тощей и толстой кишки крысы и монослоя линии клеток IPEC-J2», выполненная под научным руководством доктора биологических наук профессора А.Г. Маркова является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи – исследование роли уабаина (эндогенного регулятора активности Na,K -АТФазы) в регуляции барьерных функций кишки, имеющей существенное значение для физиологии человека и животных.

Диссертационная работа по актуальности, методическому уровню, достоверности представленных материалов, их научной новизне и практической значимости полностью соответствует критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, пп. 9-14 (в редакции постановления Правительства РФ от 21.04.2016 №335, от 20.03.2021 №426, от 26.09.2022 №1690), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор достоин присуждения искомой степени по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных.

Заведующая лабораторией физиологии почки и водно-солевого обмена Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, кандидат медицинских наук

Кутина Анна Вячеславовна

31.03.2023 г.



Подпись рукой А. В. Куртиса
я оставляю
св.кандидатом
Федерального государственного бюджетного
Учреждения науки Института эволюционной
биологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук 31.07.2020

Адрес места работы: 194223 Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, д.44

Тел. 8(812)552-30-86, e-mail: kutina_anna@mail.ru