

Отзыв официального оппонента

Золотарева Василия Авенировича доктора биологических наук, заведующего лабораторией физиологии пищеварения ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН

на диссертацию Федоровой Арины Александровны

«РЕГУЛЯЦИЯ УАБАИНОМ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ ЭПИТЕЛИЯ ТОЩЕЙ И ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫСЫ И МОНОСЛОЯ ЛИНИИ КЛЕТОК IPES-J2», представленную в Диссертационный совет 24.1.137.01 по защите кандидатских и докторских диссертаций при ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности физиология человека и животных (1.5.5)

Предоставленная к защите диссертация А.А. Федоровой является существенным продолжением фундаментальных исследований Кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета СПбГУ, где за последние 30 лет сформировалась научная школа, известная исследованиями плотных контактов и их роли в формировании селективного прациеллюлярного транспорта.

Актуальность

Исследование механизмов ферментативной и эндокринной регуляции состояния кишечного эпителиального барьера - актуальная задача фундаментальной гастроэнтерологии в связи с критической важностью транспорта воды, ионов и нутриентов при сохранении структуры слизистой оболочки. Представленная работа добавляет новые знания о патогенезе синдрома «повышенной проницаемости кишечника» ("leaky gut"), характерного для таких распространенных в современном обществе заболеваний, как болезнь Крона, синдром раздраженной кишки, целиакия, пищевые аллергии. Симптомы повышенной проницаемости кишечника сопровождают диабет 1-го типа, рассеянный склероз, волчанку, фибромиалгию, астму, артрит, синдром хронической усталости и даже отмечены при психических расстройствах. При этом поражение организма, вызванное синдромом «повышенной проницаемости кишечника», может быть очень тяжелым, учитывая, что нарушения развиваются на площади слизистой эпителия в десятки квадратных метров.

Цель и задачи исследования

Цель работы сформулирована А.А. Федоровой корректно: «изучение барьерных функций и уровня белков плотных контактов клеточной линии IPES-J2, а также тощей и толстой кишки крысы при длительном действии уабаина, а также при предварительном применении уабаина в модели липополисахарид-индуцированного нарушения функций эпителия».

Пять задач, поставленных в исследовании, полностью соотносятся с целью и охватывают все аспекты проблемы в пределах использованных методических подходов.

Положения, вынесенные на защиту, и выводы

На защиту автор обоснованно выносит 2 положения, описывающих роль убаина в регуляции барьерной функции тонкой и толстой кишки посредством изменения уровня белков плотных контактов, а также протективный эффект убаина по отношению к изменению уровня белков плотных контактов, вызванному липополисахаридом (ЛПС).

Работу завершают 5 выводов, полностью раскрывающих решение всех поставленных задач.

Научная новизна

Молекулярный комплекс белков плотных контактов, которому посвящена работа, ассоциирован с рядом регуляторных белков, в том числе, Na, K-АТФазой. Тем не менее экспериментальные данные о соотношении активности Na, K-АТФ-азы с проницаемостью плотных контактов немногочисленны и получены в основном на культуре клеток. В представленной работе в качестве инструмента для модуляции работы Na, K-АТФазы использован ее специфический лиганд убаин в редко применяемом наномолярном диапазоне концентраций, обычном для системного кровотока.

Впервые с применением комплекса физиологических и молекулярно-биологических методов описано регулирующее действие убаина *in vivo* по отношению к барьерным свойствам эпителия в разных сегментах кишки. В частности, в толстой кишке показано увеличение уровня белков плотных контактов клаудинов, обеспечивающих непроницаемость эпителия, а в тощей кишке выявлено уменьшение уровня клаудинов, которые регулируют транспорт воды и ионов натрия по парацеллюлярному пути.

Полученные впервые в ходе комбинированного применения убаина и ЛПС результаты дают основания считать, что применение убаина перед ЛПС вызывает протективное увеличение уровня клаудина-1, -3, -8 и трицеллюлина, и снижение уровня клаудина-2 в эпителии тощей и толстой кишки.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая и практическая значимость исследования не вызывают сомнений. Фундаментальное биологическое значение работы заключается в углублении понимания принципа компартментализации как динамического сопряжения клеточных и тканевых

процессов, в том числе трансцеллюлярного и парацеллюлярного транспорта. В частности, работа вносит вклад в анализ молекулярных и гормональных механизмов регуляции тканевых барьеров.

Полученные результаты могут быть интересны при выработке тактики предупреждения и лечения функциональных расстройств кишечника. Известно, что результаты диссертации включены в учебные курсы по физиологии в рамках программы бакалавриата, используются в специализированных курсах для магистров («Иммунология воспаления», «Молекулярная эндокринология», «Тканевые барьеры») на биологическом факультете Санкт-Петербургского государственного университета, а также могут быть использованы при чтении курсов в медицинских и фармацевтических ВУЗах.

Методы исследования, достоверность и апробация полученных результатов

Работа выполнена с применением впечатляющего набора физиологических, а также передовых молекулярных и иммуногистохимических методов исследования, которые, как показывает их детальное описание, автор хорошо освоила.

В частности, освоен метод поддержания культуры клеток с оценкой электрического сопротивления нарастающего клеточного монослоя. Широко применен метод определения специфических белков - Вестерн-блот. Использованы иммунофлуоресцентное окрашивание белков плотных контактов и конфокальная лазерная микроскопия. Применена световая микроскопия срезов тонкого и толстого кишечника. Также освоена работа с бодрствующими экспериментальными животными, которым в течение 4 дней вводили перпараты. Электрофизиологические характеристики и проницаемость изолированного эпителия кишечника исследованы в камере Уссинга.

Достоверность полученных результатов и выводов подтверждается, прежде всего, методологией исследования, позволившей получить сопоставимые данные на моделях разного уровня организации (клеточном и органно-тканевом). Адекватный набор экспериментальных методов обеспечил точность и воспроизводимость полученных данных. Статистическая достоверность выявленных эффектов подтверждена применением необходимых критериев.

Исследование поддержано крупными грантами и стипендией программы межвузовского сотрудничества, т.е. уже на этапе планирования работа проходила авторитетную экспертизу. Также работа прошла серьезную апробацию на отечественных и

международных конференциях. Все это в целом подтверждает достоверность полученных выводов.

Структура диссертации.

Рукопись построена по классическому плану. За Введением следует Обзор литературы на 34 страницах (Глава 1), охватывающий все аспекты проблемы. В Главе 2 излагаются Материалы и методы исследования, о которых было сказано выше.

Результаты исследования представлены в Главах 3 и 4. В Главе 3 Раздел 3.1 описывает опыты на монослое культивируемых кишечных клеток IPEC-J2, показавшие, что уабаин (УА) в наномолярной концентрации блокирует снижение трансэпителиального электрического сопротивления, вызванное апикальной аппликацией ЛПС. Разделы 3.2 и 3.3 сообщают об увеличении уровня клаудина-1 и -5 в культуре клеток IPEC-J2 под действием УА. Параллельно показано повышение уровня фосфорилированной Src-киназы (усиление сигнального пути), но общий уровень cSrc не изменялся. Разделы 3.4 и 3.5 содержат экспериментальные данные о снижении уровня клаудина -1, -3 и -5 в клетках IPEC-J2 на фоне ЛПС. Эффект ЛПС по отношению к уровню клаудина-1 и -3 предотвращало предварительное культивирование с УА. ЛПС также дезорганизовал структуру клаудина -1 и -3 в клеточном монослое. Преинкубация с УА восстанавливала нарушенную ЛПС структуру флуоресцентного сигнала.

В Главе 4 приводятся результаты экспериментов на изолированной тощей и толстой кишке крысы. Разделы 4.1 и 4.2 содержат информацию о том, что УА не влиял на снижение массы тела на фоне ЛПС, инъецированного системно, но в тонкой кишке предотвращал уменьшение трансэпителиального сопротивления и восстанавливал на фоне ЛПС нормальный ток короткого замыкания. В толстой кишке упомянутые электрофизиологические параметры от воздействий не менялись. В Разделе 4.3 сообщается, что в тощей кишке УА блокировал увеличение проницаемости эпителия для флуоресцеина, стимулированное ЛПС. В толстом кишечнике УА и ЛПС эффекта не имели. В разделе 4.4 приводятся данные о морфологии стенки тощей кишки, указывающие на увеличение толщины слизистого эпителия, величины крипт и ворсинок на фоне действия УА. ЛПС вызывал дистрофические изменения в эпителии тощей и толстой кишки, которые купировались предварительным введением УА. В разделе 4.5 автор собрала данные Вестерн-блота об уровне белков плотных контактов в сегментах кишечника. Предварительное введение УА приводило в тощей кишке к снижению уровня клаудинов -2 и -8, но не влияло на клаудин -1 и -5. Кроме того, УА предотвращал снижение уровня

белков плотных контактов под действием ЛПС. В толстой кишке УА приводил к увеличению клаудина-1 и уменьшению уровня клаудина -2, а также блокировал увеличение уровня порообразующего клаудина-2 на фоне ЛПС.

Результаты экспериментов суммированы, проанализированы и сопоставлены с литературными данными в Главе Обсуждение. Автор заключает, что под действием наномолярной дозы УА происходит сопряжение трансцеллюлярного и парацеллюлярного транспорта. В кишечном эпителии согласно предположениям автора сохраняется активность Na, K-АТФазы, но высвобождается и фосфорилируется cSrc, которая в данных условиях стимулирует увеличение уровня барьерных клаудинов -1 и -5 и снижает уровень порообразующего клаудина-2. За счет этого купируется действие ЛПС, дезорганизирующего межклеточные контакты, т.е. УА предотвращает дисфункцию эпителия кишки при липополисахарид-индуцированном повреждении.

Завершают рукопись Выводы и Список литературы.

Личный вклад автора

Анализ рукописи и сопоставление глубины и профессиональности изложения различных этапов исследования позволяет утверждать, что все разделы написаны автором самостоятельно. Вполне также очевидно, что автор внесла основной вклад в разработку концепции, экспериментальную работу и анализ результатов.

Стиль и оформление; публикации по теме диссертации

Рукопись занимает 128 страниц машинописного текста, включая список сокращений и литературы (270 источников). Работа содержит 4 таблицы и 21 рисунок. Диссертация и автореферат написаны в хорошем научном стиле, число опечаток минимальное. Оформление соответствует требованиям ВАК.

По материалам исследования опубликовано 5 статей, что также удовлетворяет требованиям ВАК.

Вопросы и замечания для дискуссии

Принципиальных замечаний и возражений по поводу рукописи нет. В то же время есть вопросы для дискуссии.

Вопрос 1. Автор несколько раз заявляет о важной роли Src-киназы в восстановлении барьерной функции кишечного эпителия, препятствующей его разрушению в ходе ЛПС-индуцированного воспаления. Однако известно, что Src – ERK1/2 сигнальный путь,

напротив, стимулирует лизис клаудинов. Какие особенности объекта исследования или эксперимента изменяют направленность действия Src-киназы в сторону стимуляции синтеза барьерных клаудинов?

Вопрос 2. Как можно описать физиологическую роль гормона надпочечников убаина в организации трансцеллюлярных и парацеллюлярных ионных потоков (в частности Na), и при каких нормальных или патологических состояниях концентрация убаина в кровотоке увеличивается настолько, чтобы модулировать ионные потоки в эпителии кишки?

Замечание 1 касается объема раздела 1.2 Обзора литературы. Большой объем этого раздела (13 стр) и приведенные в нем разнообразные сведения усложняют восприятие содержания. Деление этого раздела на параграфы, по моему мнению, облегчило бы усвоение информации читателем.

Замечание 2. Автор выборочно оценивает морфологические характеристики воспаления по толщине эпителия, величине ворсинок и крипт, упуская ряд других важных признаков, таких как инфильтрация лейкоцитов в зону базальной пластинки и отек подслизистого слоя, которые можно заметить на рисунках.

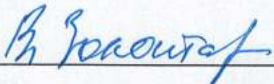
Заключение

На основании представленных материалов утверждаю, что диссертационная работа Арины Александровны Федоровой является завершенным самостоятельным научно-квалификационным исследованием, в котором содержится решение научных задач, связанных с изучением действия гормона надпочечников убаина на белки межклеточных плотных контактов в кишечном эпителии крысы в норме и при воспалении. Исследование такого рода с применением набора современных молекулярно-биологических методов впервые проведено на сегментах тонкого и толстого кишечника. Полученные автором приоритетные данные имеют значение для фундаментальной физиологии, а также имеют практическое значение, поскольку уточняют патогенез распространенных заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Работа написана автором самостоятельно и подчинена единому плану. Положения работы, дополняя и развивая друг друга, создают целостное представление о действии убаина на уровень белков клаудинов, окклюдина и трицеллюлина в плотных контактах кишечного эпителия, а также раскрывают потенциальный молекулярный механизм влияния убаина, опосредованный Src-киназой, и вовлеченность в этот процесс Na, K-АТФазы.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа полностью соответствует требованиям к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, установленным Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (в редакции от 26.09.2022) «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор А.А. Федорова заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных.

24 марта 2023 г.



Золотарев Василий Авенирович

доктор биологических наук, заведующий лабораторией
физиологии пищеварения
ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН
199034 Санкт-Петербург,
Наб. Макарова 6.
Тел.: +7-812-328-0701, +7-813-707-2738.
E-mail: zolotarevva@infran.ru

Подпись Золотарева В.А.

заверяю



 Л.А. Петрова