

Отзыв официального оппонента

Антонова Сергея Михайловича, доктора биологических наук, заведующего лабораторией сравнительной нейрофизиологии, Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

на диссертацию Ливановой Александры Андреевны
«Барьерные свойства тощей и толстой кишки крысы при воздействии ионизирующего излучения: роль белков плотных контактов», представленную в Диссертационный совет 24.1.137.01 по защите кандидатских и докторских диссертаций при ФБГУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. - физиология человека и животных

Предоставленная к защите диссертация А.А. Ливановой является частью научной работы Кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета СПбГУ, известной фундаментальными исследованиями белков плотных контактов и их роли в норме и при воздействии разнообразных повреждающих факторов.

Актуальность

Актуальной физиологической задачей является исследование барьерных свойств кишечника при патологическом воздействии. Одним из физических факторов, оказывающих воздействие на все системы тканей и органов, в том числе на кишечный эпителий, является ионизирующее излучение. При развитии кишечного синдрома острой лучевой болезни повреждение кишечного барьера является основой клинической картины и причиной летального исхода. При этом известен сегмент-зависимый эффект ионизирующего излучения: тонкая кишка более радиочувствительна, в то время как толстая кишка более радиорезистентна. Механическую целостность, а также регуляцию проницаемости барьерных тканей, в том числе слизистой кишечника, обеспечивают белковые комплексы плотных контактов. Распределение белков плотных контактов в кишечнике имеет сегмент-специфичный характер, однако вопрос о связи радиочувствительности разных сегментов ЖКТ с мозаикой белков плотных контактов остается невыясненным. Кроме того, воздействие на белки плотных контактов с помощью модулирующего агента потенциально может оказывать протекторное действие в отношении лучевого поражения кишечника, что делает поиск такого препарата актуальной научной задачей.

Цель и задачи исследования

Цель работы сформулирована А.А. Ливановой корректно: «изучение роли белков плотных контактов в обеспечении барьерных функций тощей и толстой кишки крыс при воздействии ионизирующего излучения, а также при введении убаина».

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 три положения. Одно из них постулирует, что сегмент-зависимая лучевая реакция кишечника сопровождается сегмент-зависимым воздействием ионизирующего излучения на плотные контакты. Второе положение отражает наблюдение о том, что воздействие излучения в дозе 2 Гр приводит к изменению клаудина-3 в тощей кишке. Третье положение описывает протекторную роль убаина в отношении барьерных функций толстой кишки, опосредованную предотвращением повышения уровня клаудина-2, вызванного облучением.

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

Научная новизна

Существующие данные об изменении уровня белков плотных контактов при воздействии ионизирующего излучения немногочисленны и получены с использованием разных экспериментальных моделей. В представленной работе впервые с использованием комплекса физиологических и молекулярно-биологических методов исследованы шесть белков плотных контактов (клаудин-1, -2, -3, -4, окклюдин, трицеллюлин) в двух сегментах кишечника крысы в условиях облучения. Схема экспериментов позволила получить исчерпывающие доказательства сегмент-зависимого изменения мозаики плотных контактов в тощей и толстой кишке, сопровождающего сегмент-зависимую лучевую реакцию этих отделов. Впервые показано, что в тонкой кишке облучение в дозе 10 Гр приводит к существенной реорганизации плотных контактов, в то время как в толстой кишке значительно изменяются уровни клаудина-2 и -4 при воздействии в той же дозе.

Дозозависимый эффект ионизирующего излучения был также продемонстрирован в представленной работе. Впервые показано, что комплекс плотных контактов тощей кишки является чрезвычайно чувствительной к воздействию излучения структурой: уже при облучении в дозе 2 Гр, которая не вызывает развития лучевой травмы кишки, наблюдалось повышение уровня клаудина-3 в этом сегменте.

Ранее была описана функциональная связь Na, K- АТФазы и клаудинов плотных контактов в норме и при патологии. В данной работе впервые показано, что

специфический лиганд Na, K- АТФазы убаин способен модулировать уровень белков плотных контактов в условиях лучевого поражения. К приоритетным результатам относятся данные о том, что введение убаина предотвращало повышение клаудина-2, вызванного воздействием в дозе 10 Гр, и имело протекторный эффект в отношении поражения барьерных функций эпителия при облучении.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенное исследование имеет высокую теоретическую и практическую значимость. Фундаментальное физиологическое значение работы заключается в наблюдении роли мозаики плотных контактов в сегмент-специфичном изменении барьерных функций кишки при патологическом воздействии. Работа также вносит вклад в анализ регуляции тканевых барьеров и продолжает фундаментальное исследование связи клаудинов и Na, K-АТФазы.

Полученные данные о протекторной роли убаина в отношении лучевой травмы толстой кишки открывает путь к разработке новых тактик предупреждения и лечения функциональных расстройств кишечника при радиационном поражении. Результаты диссертации могут быть использованы в материалах курсов для магистров («Частная эндокринология», «Спецглавы по физиологии»), читаемых на Биологическом факультете Санкт-Петербургского государственного университета, а также при чтении курсов для студентов медицинских вузов.

Методы исследования, достоверность и апробация полученных результатов

Работа представляет собой обширное исследование, выполненное с применением ряда физиологических, молекулярно-биологических и иммуногистохимических методов, детально описанных в соответствующем разделе текста диссертации. Дизайн исследования продуман, последователен и не вызывает вопросов. В рамках исследования выполнены две серии *ex vivo* экспериментов с использованием крыс Вистар. В первой серии экспериментов исследовали сегмент- и дозо-зависимый эффект ионизирующего излучения, в связи с чем животных подвергали воздействию облучения в дозах 2 и 10 Гр. Впечатляет наличие в дизайне эксперимента ложно-облученной группы в качестве контроля на процедуру облучения, а также интактной группы крыс. Во второй серии экспериментов автор исследует барьерные функции кишки в условиях воздействия облучения и инъекций убаина. В качестве контрольных групп автор использует крыс, которым вводили физиологический раствор (контроль на процедуру инъекций) и

животных, которых подвергали процедуре ложного облучения (контроль на процедуру облучения).

В обеих сериях экспериментов использовался одинаковый набор инструментов и техник. Электрофизиологические характеристики и проницаемость фрагментов изолированного эпителия кишечника исследованы в камере Уссинга. Проводилось исследование гистологической структуры тканей тощей и толстой кишки методами светоптической микроскопии, а также измерение уровня белков плотных контактов и активированной каспазы-3 методом Вестерн-блот. Иммуноферментный анализ проводили для оценки концентрации убаина в сыворотке крови. Метод иммунофлуоресцентного анализа с последующей визуализацией сигнала на конфокальном микроскопе использовали для оценки локализации белков плотных контактов.

Адекватный набор экспериментальных методов обеспечил точность и воспроизводимость полученных данных. Так, часть результатов, полученных в первой серии экспериментов, повторен в соответствующих группах животных во второй серии. Статистическая достоверность выявленных эффектов подтверждена применением необходимых критериев и нескольких контрольных групп.

Исследование поддержано крупным грантом Российского Научного Фонда, таким образом, уже на этапе планирования работа проходила авторитетную экспертизу. Результаты исследования трижды опубликованы в международных индексируемых журналах и представлены на конференциях. Все это в целом подтверждает достоверность полученных выводов.

Структура диссертации.

Текст диссертации имеет следующие разделы: Список сокращений, Введение, Обзор литературы (Глава 1), Материалы и методы исследования (Глава 2), Главы 3 и 4, описывающие результаты исследования, Заключение, Выводы и Список литературы.

Обширный раздел Материалы и методы (глава 2) детально описывает все этапы исследования, упомянутые выше, и демонстрируют, что автор освоила и свободно владеет всеми использованными техниками.

Обзор литературы изложен на 33 страницах и представляет собой тщательно описание имеющихся к настоящему времени публикаций, являющихся основополагающими для данной работы. Автор детально ознакомлен с текущими исследованиями по теме, цель и задачи диссертационной работы логично связаны с

существующими научными проблемами и актуальными вопросами этой области физиологии, а результаты дополняют накопленное научным сообществом знание.

Результаты двух серий экспериментов описаны в главах 3 и 4. В Главе 3 в Разделах 3.1 и 3.2. показано биоиндикационное подтверждение поглощенной дозы ионизирующего излучения: воздействие в дозе 2 Гр не приводило к изменению веса животных, в то время как воздействие в дозе 10 Гр вызывало существенное снижение веса, а также уровня лейкоцитов в крови. Раздел 3.3 демонстрирует дозо- и сегмент- зависимый эффект ионизирующего излучения на электрофизиологические характеристики кишечника крысы. Доза 2 Гр не вызывала их изменения, в то время как облучение в дозе 10 Гр приводило к повышению или понижению трансэпителиальной разности потенциалов в зависимости от сегмента, снижению сопротивления и повышению тока «короткого замыкания» в толстой и тощей кишке крыс. При этом указанные эффекты в тонкой кишке были выражены значительно, чем в толстой. Сегмент-зависимая лучевая реакция отражалась в результатах исследования межклеточной проницаемости и гистологической структуры ткани, описанных в разделах 3.4 и 3.5. В тощей кишке проницаемость для флуоресцеина натрия увеличивалась при облучении, а в толстой кишке облучение в любой дозе не приводило к изменению межклеточной проницаемости. В тонкой кишке воздействие облучения в дозе 10 Гр приводило к нарушению строения оси «крипты-ворсинка» слизистой, а также подслизистой основы, в то время как в толстой кишке наблюдались менее существенные повреждения слизистой и изменение толщины мышечных слоев, но не подслизистой основы. Наиболее важным в этой главе является раздел 3.6, в котором показано, что указанные различия в лучевой реакции сегментов на одну и ту же дозу сопровождаются разной степенью реорганизации белков плотных контактов. Приоритетным является также результат, отражающий повышение уровня клаудина-3 в тонкой кишке при воздействии дозы 2 Гр, которая не вызывает существенных функциональных изменений кишечного барьера. Неожиданным является наблюдение снижения уровня про-апоптотической каспазы-3 при воздействии излучения в дозе 10 Гр.

В Главе 4 приводятся результаты экспериментов при воздействии излучения и сочетанном введении убаина. Разделы 4.1 и 4.2 содержат информацию об итоговом уровне убаина в сыворотке крови на момент исследования, а также, что убаин не влиял на снижение массы тела на фоне ионизирующего излучения. В разделе 4.3 и 4.4 содержатся сведения о регуляции убаином электрофизиологических характеристик и проницаемости кишечника. В целом, введение убаина влияло на трансэпителиальное

сопротивление и ток короткого замыкания в толстой кишке, частично предотвращая их изменение, вызванное облучением. В соответствии с разделом 4.5 инъекции убаина частично компенсировали уменьшение глубины крипты, вызванное облучением в дозе 10 Гр в толстой кишке. Результаты, описанные в разделах 4.6 и 4.7 демонстрируют, что указанные протекторные эффекты убаина в толстой кишке сопровождалось предотвращением повышения и перераспределения клаудина-2 в толстой кишке.

Результаты экспериментов суммированы, проанализированы и сопоставлены с литературными данными в главе Заключение. Автор приходит к выводу, что сегмент-зависимая реакция разных отделов кишки крысы опосредуется сегмент-зависимым изменением мозаики плотных контактов в ответ на ионизирующее излучение. Кроме того, плотные контакты, по-видимому, являются крайне чувствительной к облучению структурой, так как их реорганизация имеет место даже при облучении в дозе, не вызывающей функциональных нарушений кишечного барьера. Инъекции убаина предотвращают нарушение барьерных функций толстой, но не тощей кишки крысы, при воздействии ионизирующего излучения в дозе 10 Гр. Завершают рукопись Выводы и Список литературы.

Личный вклад автора

Последовательность и детальность изложения результатов исследования в тексте диссертационной работы позволяют утверждать, что все опыты выполнены автором самостоятельно. Очевидно, что автор принимала непосредственное участие в разработке концепции, продумывании дизайна серий экспериментов и анализе результатов.

Стиль и оформление; публикации по теме диссертации

Рукопись занимает 135 страницы машинописного текста, включая список сокращений и литературы (252 источников). Работа содержит 3 таблицы и 27 рисунков. Диссертация и автореферат написаны в хорошем научном стиле, число опечаток минимальное. Оформление соответствует требованиям ВАК.

По материалам исследования опубликовано 3 научные статьи, 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 описывает известную в литературе интенсификацию гибели клоногенных клеток крипт кишечника в ходе апоптоза в связи с проведением облучения. Однако в данном исследовании через 72 ч после воздействия в дозе 10 Гр наблюдалось снижение уровня активированной про-апоптотической каспазы-3, что является достаточно неожиданным результатом. Как автор объясняет полученный результат в отношении экспрессии каспазы-3?

Вопрос 2. Существуют ли какие-либо физиологические состояния, которые характеризуются увеличением концентрации эндогенного убаина в крови? Возможно ли при этом достичь протекторного эффекта убаина в отношении ионизирующего излучения без введения внутрибрюшинных инъекций?

Заключение

На основании представленных материалов утверждаю, что диссертационная работа Александры Андреевны Ливановой представляет собой ценный вклад в исследование физиологических механизмов регуляции тканевых барьеров в патологических условиях. Автор рассмотрела теоретические аспекты проблемы лучевого поражения кишечника и провела глубокий анализ актуальной литературы. Методология и аналитические подходы работы являются обоснованными, а полученные результаты представляют широкий интерес для научного сообщества. Впервые показана протекторная роль убаина в отношении лучевого поражения толстой кишки путем регуляции уровня и локализации клаудина-2, что продолжает исследования этого агента как потенциального модулятора белков плотных контактов в норме и при патологии.

Работа написана автором самостоятельно, хорошо структурирована, концепция и дизайн исследования не вызывает замечаний. Положения, выносимые на защиту, и выводы работы дополняют друг друга, создавая целостное представление о сегмент-специфичном и дозо-зависимом действии радиации на уровень экспрессии белков клаудинов, окклюдина и трицеллюлина в плотных контактах кишечного эпителия, что определяет лучевую реакцию соответствующего сегмента. Практическая значимость работы не вызывает сомнений в связи с обнаружением протекторной роли убаина в отношении радиационного поражения толстой кишки. Это может служить отправной точкой для дальнейших исследований в области лучевого воздействия на кишечный барьер.

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. Ливансва заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией сравнительной нейрофизиологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской
академии наук,
доктор биологических наук,
20 октября 2023 г.

Сергей Михайлович Антонов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской
академии наук (ИЭФБ РАН)

Адрес: 194223, Санкт-Петербург, проспект Тореза, д. 44.

Телефон: +7 (812) 552-79-01

Электронная почта: office@iephb.ru

Подпись С.М. Антонова заверяю. Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки

Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской
академии наук,

кандидат биологических наук

20 октября 2023 г.



Гальперина Елизавета Иосифовна