

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

кандидата медицинских наук доцента Зацепина Виктора Викторовича  
на диссертационную работу Ливановой Александры Андреевны  
«Барьерные свойства тощей и толстой кишки крысы при воздействии  
ионизирующего излучения: роль белков плотных контактов»,  
представленную к защите на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. – физиология  
человека и животных

**Актуальность темы выполненной работы.** Широкое использование радиоактивных материалов и ядерных технологий в промышленности, науке, медицине и других отраслях деятельности человека приводит к повышению вероятности возникновения радиационных аварий. Ионизирующее излучение дозозависимо оказывает повреждающее воздействие на все ткани и системы органов, в том числе на желудочно-кишечный тракт (ЖКТ). Лучевая травма кишки может развиваться при облучении всего тела в результате техногенных аварий и радиационных инцидентов, а также как осложнение после лучевой терапии опухолей у онкологических больных. Как известно, локальное облучение области живота или общее облучение всего тела в дозах более 6 Гр приводит к развитию острого радиационного желудочно-кишечного синдрома, характеризующегося, в том числе, нарушением барьерной функции ЖКТ. Одной из причин нарушения барьерной функции ЖКТ является нарушение структуры комплексов плотных контактов, обеспечивающих целостность эпителия, а также селективный межклеточный транспорт ионов, воды и органических макромолекул. В связи с этим актуальными научными проблемами являются фундаментальное изучение молекулярных основ лучевого поражения кишечника и поиск средств предупреждения повреждения кишечного барьера в условиях радиационного воздействия.

В последнее время изучение комплексов плотных контактов клеток является устойчивым трендом, о чем свидетельствует количество поисковых запросов в русскоязычном сегменте сети «Интернет» за последний месяц (около 2000).

### **Оценка содержания диссертации.**

Диссертация состоит из введения, четырех глав, включающих обзор литературы, описания материалов и методов исследования, двух глав результатов экспериментальных исследований, обсуждения, выводов и списка литературы.

Работа изложена на 135 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы и 27 рисунков. Список литературы содержит 252 библиографических источника, из них 9 отечественных и 243 иностранных публикаций.

Обзор литературы посвящен детальному анализу строения кишечного эпителия, структуры и функции комплексов плотных контактов, сегмент-специфичности барьерных функций ЖКТ, радиационно индуцированному желудочно-кишечному синдрому и его профилактике, взаимодействия Na,K-АТФазы и ее ингибитора убаина с плотными контактами в норме и при патологии.

Из анализа материалов, представленных в обзоре литературы, вполне логично вытекают актуальность, цели и задачи исследования, поставленные автором:

- анализ дозо- и сегмент-зависимого воздействия облучения на электрофизиологические параметры и межклеточную проницаемость тощей и толстой кишки крыс;
- морфометрический анализ тканей тощей и толстой кишки крыс в условиях лучевого воздействия;
- определение уровня и локализации белков плотных контактов методами Вестерн-блот и иммунофлуоресценции в тощей и толстой кишке при воздействии излучения;
- изучение электрофизиологических параметров, межклеточной проницаемости тощей и толстой кишки крыс при воздействии излучения в условиях введения убаина;
- морфометрический анализ тканей тощей и толстой кишки крыс, а также изучение уровня и локализации белков плотных контактов при воздействии ионизирующего излучения в условиях введения убаина.

Обзор литературы свидетельствует о всестороннем глубоком изучении автором современного состояния проблем барьерных свойств ЖКТ и роли плотных контактов в проницаемости кишечной стенки.

Во второй главе представлены материалы и методы исследования. В процессе работы автором использован достаточно представительный экспериментальный материал. В ходе диссертационного исследования применялся широчайший спектр радиобиологических, гематологических, цитохимических, электрофизиологических, иммуногистохимических, гистологических методик. В частности, для определения уровня белков семейства клаудина, окклюдина, трицеллюлина и активированной каспазы-3 и сравнения их содержания в облученных группах с контрольными, использовался метод Вестерн-блот анализа. Исследование локализации белков плотных контактов в срезах тканей тонкой и толстой кишки проводили с помощью иммунофлуоресцентного исследования.

В главе 3 приводится изучение дозо- и сегмент-специфичного воздействия ионизирующего излучения на барьерные функции тощей и толстой кишки крыс. Показано, что облучение животных в дозах 2 и 10 Гр приводило к потере массы тела по сравнению с интактными и ложно-облученными животными. Кроме того, облучение сопровождалось значительной постлучевой лейкопенией, которая в основном выражалась в снижении числа лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов, что

соответствует ожидаемой гематологической картине, наблюдаемой при облучении крыс в дозе 10 Гр.

Ионизирующее излучение дозо-специфично воздействовало на разность потенциалов в тощей кишке, при этом облучение в дозе 10 Гр вызывало существенную деполяризацию. Так в толстой кишке облучение в дозе 10 Гр приводило к существенной поляризации, в то время как воздействие в дозе 2 Гр не влияло на разность потенциалов.

Также показано, что повышение межклеточной проницаемости тощей кишки при облучении в дозе 10 Гр совпадает со снижением поляризации, снижением трансэпителиального сопротивления и повышением тока «короткого замыкания», наблюдаемыми в этой же группе. Полученные результаты указывают на существенное нарушение барьерных и транспортных функций тощей кишки в условиях лучевого поражения в дозе 10 Гр. Кроме того, показано, что в тощей кишке доза 10 Гр приводила к снижению поляризации, а в толстой кишке – к повышению, что отражает сегмент-специфичность воздействия ионизирующего излучения на тонкую и толстую кишку.

При гистологическом исследовании ткани тонкой и толстой кишки подтвержден дозо-зависимый характер повреждений: облучение в дозе 2 Гр оказывало влияние только на слизистую оболочку, в то время как облучение в дозе 10 Гр затрагивало, как морфологию ворсинок и крипт, подслизистую основу, так и мышечные слои стенки.

При изучении влияния излучения на белки плотных контактов также отмечен дозо-зависимый эффект, проявляющийся разнонаправленным изменением уровня белков в тощей кишке при облучении в дозе 10 Гр, в то время как доза 2 Гр вызывала повышение уровня только клаудина-3. В толстой кишке при воздействии облучения в дозе 10 Гр изменились уровни только клаудинов-2 и -4. Данные результаты демонстрируют сегмент-специфичный эффект ионизирующего излучения и показывают, что менее выраженная реакция на облучение толстой кишки сопровождается менее резкой реорганизацией комплексов плотных контактов в этом отделе.

Результаты собственных исследований в отношении дозо- и сегмент-зависимости, изложенные в данной главе, закономерны и подтверждены автором в экспериментах.

Четвертая глава посвящена изучению барьерных функций тощей и толстой кишки крыс при воздействии ионизирующего излучения в условиях введения убаина.

В результате проведенных исследований показано, что предварительное введение убаина не оказывало протективного воздействия в тощей кишке: не предотвращало потери массы тела, вызванной воздействием ионизирующего излучения; деполяризации, наблюдаемой при воздействии ионизирующего излучения в дозе 10 Гр; не предотвращало повышения тока «короткого замыкания», вызываемого облучением в дозе 10 Гр; не предотвращало повышения проницаемости кишки; не предотвращало изменения уровня белков плотных контактов.

Вместе с тем показано, что профилактическое введение убаина частично компенсировало постлучевые изменения барьерных функций толстой кишки.

Введение убаина предотвращало снижение трансэпителиального сопротивления тока «короткого замыкания» толстой кишки, частично компенсировало уменьшение глубины крипты, вызванное воздействием излучения в дозе 10 Гр. Указанные эффекты сопровождалось предотвращением повышения уровня и перераспределения клаудина-2, наблюдаемого в толстой кишке при облучении.

### **Научная новизна.**

Научная новизна работы определяется использованием комплекса физиологических и молекулярно-биологических методов. Продemonстрировано дозо- и сегмент-специфичное воздействие ионизирующего излучения на барьерные функции кишечного эпителия крысы, опосредованное разной степенью реорганизации комплексов плотных контактов. Кроме того, впервые показано, что облучение в дозе 2 Гр вызывает изменение уровня клаудина-3 в эпителии тощей кишки без изменения проницаемости кишечного барьера. Впервые показано, что введение убаина предотвращает вызванное облучением нарушение барьерных функций толстой кишки. Впервые установлено, что протективное действие убаина в условиях радиационного поражения опосредовано предотвращением повышения уровня клаудина-2.

### **Практическая значимость.**

Практическая значимость диссертации заключается:

- в изучении молекулярных основ и механизмов регуляции тканевых барьеров желудочно-кишечного тракта;
- в обнаружении протективного эффекта хронического введения убаина в отношении лучевой травмы толстой кишки, что может быть использовано в разработке новых подходов к предупреждению и лечению функциональных расстройств кишечника при радиационном поражении.

### **Достоверность и обоснованность положений, результатов и выводов диссертации.**

Результаты работы изложены в 4 выводах и 3 положениях, выносимых на защиту. Обоснованность их не вызывает сомнений, поскольку они полностью вытекают из результатов выполненных исследований, базируются на достаточном количестве использованных экспериментальных животных, большом массиве данных, проанализированных с применением современных высокоинформативных методов исследований и статистического анализа.

Основные результаты диссертации с достаточной полнотой изложены в 3-х статьях в международных рецензируемых журналах, доложены на

нескольких всероссийских и международных съездах и конференциях. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

### **Замечания и вопросы для дискуссии**

Незначительным недостатком работы является тот факт, что автор исходит из позиции однофакторного повреждения и смотрит на явления проницаемости только с позиции выраженности функции или количества белка, в то время как нарушение барьерной функции кишечника связано не только с нарушением структуры и функции комплексов плотных контактов. В первую очередь радиационно индуцированный желудочно-кишечный синдром, возникающий при облучении биологических объектов в абсолютно летальных дозах, связан с гибелью стволовых клеточных элементов кишечного эпителия в криптах ворсинок с последующей их денудацией. Также не интерпретирована и не обсуждена роль цитокинемии, инфильтрации и т.д. в контексте оценки проницаемости кишечной стенки.

В ходе анализа диссертации возникли вопросы, которых носят чисто дискуссионный характер:

1. Регуляция барьерных функций кишки может осуществляться, в том числе, посредством ряда белков, функционально ассоциированных с плотными контактами, в частности Na,K-АТФазой, моделирующей уровень клаудинов и следственно влияющей на проницаемость эпителия для ионов и воды. Одним из регуляторов активности Na,K-АТФазы является ее специфический лиганд убаин, синтезирующийся в коре надпочечников и гипоталамусе. Показано ли влияние убаина на уровень окклюдина, регулирующего проницаемость кишечного барьера для макромолекул?

2. В работе показано, что облучение в дозе 10 Гр приводит к существенной перестройке плотных контактов в тощей кишке по сравнению с толстой кишкой крысы, что отражает разную степень радиочувствительности сегментов кишечника. Как этот факт влияет на степень проницаемости кишечной стенки в разных отделах ЖКТ?

3. В работе показано, что облучение животных в дозе 2 Гр вызывает изменение уровня клаудина-3 в эпителии тощей кишки без изменения проницаемости кишечного барьера. Почему, по Вашему мнению, несмотря на изменения в комплексах плотных контактов кишечного эпителия при данных дозовых нагрузках, отсутствует изменение проницаемости кишечного барьера?

4. Чем обусловлено протективное действие убаина в отношении барьерных свойств толстой кишки крыс при воздействии ионизирующего излучения в дозе 10 Гр и в какой степени это повлияет на выраженность радиационно-индуцированного желудочно-кишечного синдрома?

### **Заключение**

Диссертационная работа Ливановой Александры Андреевны «Барьерные свойства тощей и толстой кишки крысы при воздействии ионизирующего излучения: роль белков плотных контактов» является

завершенным, самостоятельно выполненным квалификационным трудом, содержащим новое решение актуальной научной задачи – уточнение молекулярных основ и механизмов регуляции тканевых барьеров и направлений дальнейших исследований по снижению повреждающего действия излучений на ЖКТ. По актуальности решаемых вопросов, методическому уровню, научной новизне и практической значимости, объему, качеству и завершенности исследований работа Александры Андреевны Ливановой соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», в соответствии с постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями от 11.09.2021 г., №1539), к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. – физиология человека и животных.

Профессор кафедры  
военной токсикологии и медицинской  
защиты  
ФГБВОУ ВО Военно-медицинской академии  
имени С.М.Кирова МО РФ,  
кандидат медицинских наук доцент



Зацепин В.В.

16.10.2023

Адрес: Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская Академия им. С.М.Кирова Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, 194044, ул. Академика Лебедева, д. 6.

Тел. +7(812) 292-33-31

E-mail: [zatsepin\\_vv@mail.ru](mailto:zatsepin_vv@mail.ru).



ПОДЛИННОСТЬ ПОДЛИННО  
ЗАВЕРЕН  
НАЧАЛЬНИК ОТДЕЛА КА  
ВОЕННО-МЕДИЦИНСКОЙ  
МИНИСТЕРСТВА  
М.И.С.Р. Миличико

