

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, заведующего лабораторией гликобиологии федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации Григорьевой Эльвиры Витальевны на диссертационную работу Кожевниковой Елены Николаевны на тему «Метаболические и молекулярные механизмы регуляции эпителиальной проницаемости и системных нарушений, обусловленных воспалением кишечника» представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. - Молекулярная биология.

Актуальность темы исследования

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) относятся к числу наиболее сложных хронических патологий, в развитии которых участвуют иммунные, генетические, эпителиальные, метаболические и микробиомные факторы. Болезнь Крона и язвенный колит сопровождаются повреждением слизистой оболочки кишечника, нарушением барьерной функции эпителия, длительной активацией воспалительных реакций и нередко — развитием внекишечных проявлений. Современные представления о патогенезе ВЗК уже не ограничиваются оценкой нарушений иммунной регуляции. Все большее значение приобретают исследования перестройки цитоскелета эпителиальных клеток, межклеточных контактов, липидного и энергетического обмена, а также роли микробиоты в поддержании воспаления и системных нарушений. Однако взаимосвязь этих процессов, в частности молекулярные механизмы, определяющие потерю целостности кишечного барьера, остается во многом нераскрытой.

Особую актуальность имеют поиск общих механизмов повреждения эпителия, реализующихся при разных вариантах хронического воспаления, выявление метаболических мишеней для коррекции барьерной дисфункции и изучение роли микробиоты в формировании коморбидных состояний. В этом отношении исследование Е. Н. Кожевниковой отвечает актуальным направлениям молекулярной биологии, биомедицины и исследований ВЗК.

Основные научные результаты, полученные автором в работе

Одним из центральных результатов диссертационного исследования является установление универсального характера нарушений актинового цитоскелета в кишечном эпителии при хроническом воспалении. На различных экспериментальных моделях автор показала уменьшение содержания F-актина в апикальной и латеральной областях

эпителиоцитов и в биоптатах кишечника пациентов с язвенным колитом. Установлено, что снижение количества филаментного актина сопряжено с нарушением мембранной локализации белков плотных и адгезивных контактов, в том числе клаудина-3, клаудина-7, E-кадгерина и β -катенина. При этом суммарное количество исследованных белков межклеточных контактов не изменялось, что указывает на важную роль нарушений их внутриклеточного распределения и посттрансляционной регуляции в развитии барьерной дисфункции. Показано, что при хроническом колите ослабляется взаимодействие клаудина-3 с рядом актин-связывающих белков, включая α -актинин, эзрин, винкулин и компоненты комплекса Atp2/3. Данный результат конкретизирует молекулярную основу нарушения связи цитоскелета с межклеточными соединениями.

Существенным достижением работы следует считать выявление ультраструктурных изменений эпителия при хроническом воспалении: нарушений архитектуры микроворсинок, расширения плотных и адгезивных контактов, а также признаков митохондриальной дисфункции. Выполненный системно-биологический анализ транскриптомных данных позволил выделить *PREX1* как потенциальный регулятор динамики актина в условиях хронического воспаления кишечника.

В работе получены данные, свидетельствующие о важной роли сфинголипидного обмена в повреждении кишечного барьера. При хроническом колите выявлено накопление церамидов; ингибирование их синтеза сопровождалось частичным восстановлением организации F-актина, мембранной локализации клаудина-7 и β -катенина, а также уменьшением проницаемости кишечника.

Отдельный цикл исследований посвящен системным последствиям воспаления кишечника. Автором изучены изменения метаболизма глицина и триптофана, ассоциированные с микробиотой и особенностями социального, тревожноподобного и сенсомоторного поведения мышей. Кроме того, продемонстрирована связь исходного микробиомного профиля, в частности представленности *Akkermansia muciniphila* и *Bacteroides acidifaciens*, с последующей выраженностью воспалительного опухолеобразования в модели AOM/DSS.

Новизна исследования и полученных результатов

Научная новизна работы заключается прежде всего в формировании целостной концепции, объединяющей перестройку актинового цитоскелета, нарушения межклеточных контактов, изменения метаболизма липидов и микробиота-зависимые системные эффекты хронического воспаления кишечника.

Впервые снижение уровня F-актина в эпителии кишечника продемонстрировано как воспроизводимый признак хронического колита на трех экспериментальных моделях,

отличающихся механизмами индукции воспаления, и сопоставлено с результатами анализа материала пациентов с язвенным колитом. Это позволяет рассматривать нарушение динамики актина как этиологически независимый клеточный компонент патогенеза ВЗК.

Впервые с использованием фармакологических подходов и модели кишечных органоидов показано, что нарушение баланса между мономерной и полимерной формами актина непосредственно связано с дезорганизацией плотных и адгезивных контактов и повышением проницаемости эпителиального пласта.

Новыми являются результаты сравнительного исследования взаимодействий клаудина-3 в интактной ткани и при хроническом колите. Выявленное ослабление его связи с актин-связывающими белками позволяет по-новому оценить роль белковых комплексов межклеточных контактов в развитии воспалительно-ассоциированной барьерной недостаточности.

Оригинальными являются данные о связи накопления керамидов с нарушением организации актинового цитоскелета и функциональной несостоятельностью эпителиального барьера. Впервые продемонстрировано, что ингибирование биосинтеза керамидов способно частично корригировать нарушения проницаемости кишечника *in vivo*.

Впервые выявлена ассоциация между исходной численностью *A. muciniphila* и *B. acidifaciens* и восприимчивостью мышей к ассоциированному с воспалением колоректальному канцерогенезу. Дополняют новизну исследования результаты, раскрывающие возможное участие микробиота-зависимого обмена глицина и триптофана в механизмах взаимодействия по оси «микробиота–кишечник–мозг».

В целом, диссертационная работа вносит заметный вклад в развитие молекулярной биологии воспалительных заболеваний кишечника. Научная ценность исследования определяется выявлением универсальных признаков повреждения эпителия при хроническом колите, установлением роли керамидов в нарушении барьерной функции, идентификацией *PREX1* как потенциального регулятора динамики актина, а также получением новых сведений о микробиота-зависимых механизмах регуляции поведения и канцерогенеза.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Положения, выносимые на защиту, и основные выводы диссертации полностью обоснованы представленными экспериментальными данными. Последовательность исследования — от анализа структуры эпителиального барьера и клеточных взаимодействий до оценки метаболических, микробиомных и поведенческих эффектов — соответствует поставленной цели и задачам работы. Особенно важно, что основные наблюдения

относительно нарушения организации F-актина и белков межклеточных контактов воспроизведены на нескольких моделях хронического колита. Использование биопсийного материала пациентов позволяет рассматривать полученные на животных данные как имеющие потенциальную клиническую значимость.

Функциональная значимость обнаруженных изменений подтверждена опытами на кишечных органоидах, экспериментами с фармакологической модуляцией динамики актина, а также подавлением синтеза церамидов в моделях воспаления. Такой дизайн исследования позволяет аргументированно говорить не только об ассоциации выявленных процессов, но и об их вероятной функциональной взаимосвязи. Обоснованность выводов о системных эффектах хронического воспаления обеспечена сочетанием результатов исследования микробиоты, метаболомных профилей, поведенческого фенотипирования и фармакологического вмешательства.

Достоверность научных положений, выводов, рекомендаций

Достоверность результатов определяется использованием комплекса современных и взаимодополняющих экспериментальных методов. В исследовании применены модели хронического воспаления кишечника, основанные на различных этиопатогенетических механизмах, а также модель AOM/DSS воспалительно-ассоциированного колоректального рака, кишечные органоиды, образцы биопсийного материала и модели фармакологической коррекции.

Для решения поставленных задач использованы самые современные методы - трансмиссионная электронная, световая и конфокальная микроскопия, иммуногистохимия, иммуноблоттинг, коиммунопреципитация, масс-спектрометрия, транскриптомный анализ, ЯМР-метаболомика, ВЭЖХ-масс-спектрометрия и анализ цитокинов. Измерение барьерной функции выполнено как *in vitro*, так и *in vivo*, что повышает убедительность полученных результатов.

Автор применил корректные статистические процедуры с использованием параметрических и непараметрических методов, а также поправок на множественные сравнения. В работе использованы современные биоинформатические подходы, включая анализ дифференциальной экспрессии генов, WGCNA, байесовское моделирование, LEfSe-анализ и методы оценки микробиомных профилей.

Материалы диссертации нашли отражение в 25 статьях, опубликованных в рецензируемых изданиях, индексируемых в Scopus, Web of Science и РИНЦ. Основные результаты были апробированы в 14 докладах на 10 российских и международных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 266 страницах машинописного текста. Она включает введение, обзор литературы, раздел «Материалы и методы», главы, содержащие результаты собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, список сокращений и библиографический список.

Работа иллюстрирована 36 рисунками и содержит 3 таблицы. Библиографический список включает 516 источников, что отражает основательную проработку автором современной отечественной и зарубежной литературы по проблематике воспалительных заболеваний кишечника, эпителиального барьера, метаболической регуляции и микробиоты.

Оценка содержания диссертационной работы

Диссертация имеет ясную структуру и отличается логичным развитием научной линии, текст написан очень грамотно и прекрасно иллюстрирован 36 рисунками.

В **литературном обзоре** на 57 страницах автор последовательно рассматривает современное состояние исследований ВЗК, организацию кишечного барьера, значение микробиоты и метаболических нарушений, роль актинового цитоскелета и межклеточных контактов, а также механизмы формирования системных проявлений воспаления.

В главе **Материалы и Методы** на 21 странице перечислены материалы и приведено подробное описание методик, использованных в диссертационной работе. Они включают самые современные физико-химические и молекулярно-биологические методы, которые полностью соответствуют поставленным задачам.

Экспериментальная часть представлена на 87 страницах в 5 главах, написана очень логично и включает значительный объем разнообразных исследований. Использование нескольких моделей хронического колита позволяет оценить устойчивость выявляемых закономерностей, а объединение морфологических, молекулярно-биологических, метаболомных и микробиомных методов формирует убедительную доказательную основу работы. Главы с собственными результатами образуют взаимосвязанную последовательность. От анализа ультраструктурных нарушений кишечного эпителия и исследования роли F-актина автор переходит к оценке вклада сфинголипидного обмена в барьерную дисфункцию, затем рассматривает участие микробиоты и аминокислотного метаболизма в системных эффектах хронического колита и, наконец, анализирует связь исходного состава микробиоты с канцерогенезом.

В главе **Обсуждение** на 25 страницах автор подробно обсуждает полученные в данной работе результаты, уделяет внимание описанию возможностей практического применения результатов данного исследования. Завершается работа заключением и выводами, которые полностью соответствуют полученным результатам.

В целом, диссертация представляет собой завершенное самостоятельное исследование, выполненное на самом передовом мировом уровне, результаты которого расширяют представления о патогенезе воспалительных заболеваний кишечника. Работа соответствует паспорту научной специальности 1.5.3. «Молекулярная биология», а ее материалы обладают несомненной фундаментальной значимостью и перспективой дальнейшего развития в направлении персонализированной оценки риска и коррекции воспалительных заболеваний кишечника.

Очень высокий уровень выполнения самой исследовательской работы и ее описания в тексте диссертации практически не вызывает вопросов. Немногочисленные замечания в основном относятся к оформлению работы или некоторым техническим моментам:

1. Задача 1 (стр.8) сформулирована как «Изучить... организацию ...эпителия...на мышцах и данных от пациентов с болезнью Крона», однако в разделе Методы описано, что в исследование были включены только 3 пациента с язвенным колитом. Остается не совсем ясным насколько результаты по исследованию пациентов с язвенным колитом соответствуют таковым у пациентов с болезнью Крона.

2. Ссылки на англоязычных авторов приводятся на английском языке, но в большинстве мест союз "and" заменен на русское "и" (например, стр. 19 - Dolinger и Torres, 2024; Gecse и Vermeire, 2018 и т.д.), хотя в некоторых местах и встречается более корректная форма "Langfelder and Horvath, 2008" (стр. 113).

Эти замечания несколько не снижают ценности и значимости данной работы, которая представляет собой прекрасное сочетание высокопрофессионального фундаментального исследования и перспективной разработки биомаркеров и терапевтических мишеней при ВЗК, столь необходимых в клинической практике.

Заключение

Диссертационная работа Е. Н. Кожевниковой на тему "Метаболические и молекулярные механизмы регуляции эпителиальной проницаемости и системных нарушений, обусловленных воспалением кишечника" представляет собой оригинальное, логически завершенное исследование, в котором на основе современных молекулярно-биологических, морфологических, метаболомных, микробиомных и биоинформатических подходов изучены механизмы нарушения кишечного эпителиального барьера при хроническом воспалении. Автором сформирована интегративная модель, связывающая метаболические изменения в эпителии, дестабилизацию актинового цитоскелета, дисфункцию межклеточных контактов, изменения кишечной микробиоты и развитие системных эффектов.

Диссертационная работа Кожевниковой Елены Николаевны по своему научному уровню, актуальности, степени новизны, обоснованности выводов и значимости полученных результатов соответствует всем требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. №335, от 20 марта 2021 года №426, от 11 сентября 2021 г. №1539, от 26 октября 2023 г. №1786, от 25 января 2024 г. №62), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. «Молекулярная биология».

Даю согласие на сбор, обработку, хранение и передачу персональных данных в диссертационный совет 24.1.082.01, созданный на базе ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН

Официальный оппонент

Доктор биологических наук

(03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология,

03.01.07 – Молекулярная генетика)

Заведующий лабораторией гликобиологии

ФГБУН «ФИЦ ФТМ»



Григорьева Эльвира Витальевна

Ученый секретарь

ФГБУН «ФИЦ ФТМ»

Доктор биологических наук

Колдышева Елена Владимировна



ФГБУН «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Адрес: 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2. Тел. +7(383)274-95-57, e-mail: elv_grig@mail.ru