



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки**

**Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук (ИМБ РАН)**

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,

тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@eimb.ru

ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе

Кожевниковой Елены Николаевны

НА ТЕМУ

**«МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
РЕГУЛЯЦИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ И СИСТЕМНЫХ
НАРУШЕНИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ ВОСПАЛЕНИЕМ КИШЕЧНИКА»**

представленной к защите на соискание ученой степени

доктора биологических наук

по специальности 1.5.3. - Молекулярная биология

Диссертационная работа Кожевниковой Елены Николаевны «Метаболические и молекулярные механизмы регуляции эпителиальной проницаемости и системных нарушений, обусловленных воспалением кишечника», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. «Молекулярная биология», посвящена актуальной фундаментальной и биомедицинской проблеме —

выявлению механизмов нарушения кишечного эпителиального барьера и системных последствий хронического воспаления кишечника.

Актуальность темы выполненной работы

Воспалительные заболевания кишечника, включающие болезнь Крона и язвенный колит, характеризуются хроническим рецидивирующим течением, сложной многофакторной этиологией, высоким риском развития осложнений и ограниченной эффективностью терапии у части пациентов. Центральным звеном их патогенеза является повреждение эпителиального барьера, приводящее к повышению кишечной проницаемости, проникновению микробных антигенов в слизистую оболочку, поддержанию воспалительной реакции и развитию системных нарушений.

При этом недостаточно изученными остаются молекулярные механизмы, объединяющие воспалительную перестройку эпителия, нарушения межклеточных контактов, изменения метаболизма липидов и аминокислот, а также сдвиги состава кишечной микробиоты. Особый интерес представляет выявление универсальных, этиологически независимых механизмов повреждения эпителиального барьера, а также факторов, связывающих локальное воспаление кишечника с изменениями поведения и восприимчивостью к воспалительно-ассоциированному колоректальному канцерогенезу. В этой связи избранное автором направление исследования представляется своевременным, научно обоснованным и имеющим несомненную фундаментальную и потенциальную практическую значимость.

Основные научные результаты, полученные автором в работе

В диссертационном исследовании получен комплекс новых данных о клеточных, молекулярных и метаболических механизмах нарушения кишечного барьера в условиях хронического воспаления.

Автором показано, что снижение количества филаментного актина и нарушение организации актинового цитоскелета являются общими

характеристиками кишечного эпителия при хроническом колите различной этиологии. Данный результат получен на трех моделях хронического воспаления кишечника — генетически обусловленной, химически индуцированной и Т-клеточно-опосредованной — и дополнен наблюдениями на биоптатах пациентов с язвенным колитом. Установлено, что дестабилизация F-актина сопровождается нарушением мембранной локализации белков плотных и адгезивных контактов, в том числе клаудинов, E-кадгерина и β -катенина, и приводит к повышению эпителиальной проницаемости.

Методами электронной микроскопии и морфометрического анализа выявлены ультраструктурные изменения межклеточных контактов, микроворсинок и митохондрий эпителиальных клеток при хроническом воспалении. С использованием транскриптомных данных пациентов с болезнью Крона, анализа коэкспрессионных сетей WGCNA и байесовских сетей идентифицирован ген *PREX1* как потенциальный регулятор динамики полимеризации актина при воспалении кишечника.

Существенным результатом является характеристика изменений взаимодействий белка плотных контактов клаудина-3. Методом коиммунопреципитации с последующей масс-спектрометрией показано ослабление ассоциации клаудина-3 с актин-связывающими белками, включая компоненты комплекса Arp2/3, α -актинин, эзрин и винкулин, в эпителии кишечника животных с хроническим колитом.

В работе также выявлена роль нарушений сфинголипидного обмена в развитии барьерной дисфункции. Установлено накопление церамидов в эпителиальных криптах толстой кишки при хроническом воспалении. Подавление синтеза церамидов фумонизином B1 частично восстанавливало организацию F-актина, локализацию клаудина-7 и β -катенина на мембране, а также снижало кишечную проницаемость в моделях генетически обусловленного и DSS-индуцированного колита.

Отдельный блок результатов относится к изучению системных последствий воспаления кишечника. Показано участие изменений кишечной

микробиоты и ассоциированного с ней метаболизма глицина и триптофана в формировании поведенческих особенностей животных. Кроме того, установлена положительная связь между исходной представленностью *Akkermansia muciniphila* и *Bacteroides acidifaciens* в микробиоте мышей и выраженностью ассоциированного с воспалением канцерогенеза в модели AOM/DSS.

Новизна исследования и полученных результатов

Научная новизна диссертационной работы определяется интегративным исследованием метаболических, клеточных и микробиомных механизмов, лежащих в основе нарушения барьерной функции кишечного эпителия и системных проявлений хронического воспаления.

Впервые на нескольких моделях хронического колита и в биоптатах пациентов с язвенным колитом показано, что дестабилизация актинового цитоскелета является универсальной клеточной характеристикой эпителия при воспалении кишечника, не зависящей от этиологии патологического процесса. Впервые экспериментально установлено, что направленное нарушение равновесия между полимерным и мономерным актином приводит к делокализации белков плотных и адгезивных контактов и увеличению эпителиальной проницаемости.

Впервые выполнен сравнительный анализ интерактома клаудина-3 в норме и при хроническом воспалении кишечника. Полученные данные раскрывают ранее не описанный механизм нарушения связи белка плотных контактов с актин-связывающими белками в эпителии при колите.

Новым является выявление связи накопления церамидов с нарушением организации актинового цитоскелета и барьерной функции кишечника, а также демонстрация частичного восстановления барьерных свойств при фармакологическом ингибировании биосинтеза церамидов. Это позволяет обоснованно рассматривать компоненты сфинголипидного метаболизма в качестве перспективных мишеней для дальнейших исследований.

Впервые показано, что исходное содержание *A. muciniphila* и *B. acidifaciens* в кишечной микробиоте связано с восприимчивостью животных к воспалительному колоректальному канцерогенезу. Получены новые данные о роли микробиота-зависимых изменений обмена глицина и триптофана в регуляции социального и тревожноподобного поведения на моделях хронического воспаления кишечника.

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

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, логично следуют из поставленной цели, конкретных задач исследования и совокупности полученных экспериментальных результатов. Автором последовательно реализован многоуровневый дизайн исследования: от оценки ультраструктуры эпителиального барьера и локализации белков межклеточных контактов до транскриптомного, метаболомного, микробиомного и поведенческого анализа.

Обоснованность выводов обеспечена сопоставлением результатов, полученных на независимых моделях хронического колита различной этиологии, а также использованием данных биоптатов пациентов с язвенным колитом. Применение кишечных органоидов позволило экспериментально подтвердить функциональное значение нарушений динамики актина для сохранения целостности эпителиального барьера. Фармакологические эксперименты с модуляторами полимеризации актина и ингибитором синтеза церамидов усиливают причинно-следственную обоснованность предложенных механизмов.

Выводы о связи исходного состояния микробиоты с восприимчивостью к канцерогенезу, а также о роли метаболизма аминокислот в функционировании оси «микробиота–кишечник–мозг», подтверждены сочетанием микробиологических, метаболомных, поведенческих и фармакологических подходов. Представленные рекомендации имеют перспективный характер, не

выходят за пределы полученных данных и соответствуют современному уровню развития исследований ВЗК.

Достоверность научных положений, выводов, рекомендаций

Достоверность результатов не вызывает сомнений и определяется использованием адекватных современным задачам исследования экспериментальных моделей, широкого спектра взаимодополняющих методов и корректных подходов к статистической обработке данных.

В работе использованы три модели хронического колита, модель воспалительно-ассоциированного колоректального рака, кишечные органоиды, материал биоптатов кишки пациентов, а также методы световой, конфокальной и трансмиссионной электронной микроскопии. Применены транскриптомное секвенирование, анализ дифференциальной экспрессии, WGCNA, построение байесовских сетей, масс-спектрометрический анализ белковых взаимодействий, ЯМР-метабомика, ВЭЖХ-масс-спектрометрия, мультиплексный анализ цитокинов, иммуноблоттинг, иммуногистохимия, оценка митохондриальной функции и поведенческое фенотипирование животных.

Статистическая обработка проведена с использованием параметрических и непараметрических критериев, поправок на множественные сравнения и специализированных биоинформатических методов, включая LefSe, WGCNA и байесовские сети. Результаты исследования опубликованы в 25 научных статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в Scopus, Web of Science и РИНЦ, и представлены в 14 докладах на 10 российских и международных научных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 266 страницах машинописного текста. Работа включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, главы с результатами собственных исследований, обсуждение, выводы, список сокращений и список литературы.

Рукопись содержит 36 рисунков и 3 таблицы. Список литературы включает 516 источников. Такой объем библиографического материала свидетельствует о широте проведенного анализа и глубоком владении автором современным состоянием исследуемой проблемы. По теме диссертации опубликовано 25 научных работ в рецензируемых изданиях, индексируемых в международных и российских библиографических базах данных.

Оценка содержания диссертационной работы

Содержание диссертационной работы отличается внутренней логикой и последовательностью изложения. Литературный обзор отражает современное состояние исследований воспалительных заболеваний кишечника, подробно рассматривает структурно-функциональную организацию кишечного барьера, роль микробиоты, метаболических нарушений, цитоскелета и межклеточных контактов в патогенезе ВЗК, а также проблему системных последствий хронического воспаления.

Раздел «Материалы и методы» содержит описание большого набора экспериментальных моделей и современных молекулярно-биологических, морфологических, биохимических, метаболомных, микробиомных и вычислительных методов. Представленные методические подходы соответствуют поставленным задачам и позволяют всесторонне оценить механизмы нарушения эпителиальной проницаемости и системных эффектов воспаления кишечника.

Основная часть диссертации выстроена от анализа клеточной организации эпителия и роли актинового цитоскелета к исследованию метаболизма липидов, микробиоты, аминокислотного обмена, нейроповеденческих эффектов и канцерогенеза. Такое построение обеспечивает целостное восприятие работы и позволяет сформулировать интегративную модель, в которой метаболические нарушения выступают важным связующим звеном между хроническим воспалением, повреждением кишечного барьера и системными проявлениями заболевания.

В целом содержание диссертации Кожевниковой Е. Н. соответствует заявленной специальности 1.5.3. «Молекулярная биология», а полученные результаты представляют значимый вклад в развитие представлений о молекулярных механизмах патогенеза воспалительных заболеваний кишечника.

Однако рецензент находит необходимым указать на ряд замечаний дискуссионного характера, возникших в ходе прочтения работы:

- 1) Бокаловидные клетки (гоблетовские клетки) - главный источник секреторного муцина в организме человека и животных. Известно, что у мышей *Muc2*^{-/-} морфология и функция бокаловидных клеток критически нарушены. Считается, что эта популяция истощается (клетки погибают от апоптоза) в попытке компенсировать недостаток в муцине. Возможно, что структурные изменения, связанные с нарушением эпителиальной проницаемости, опосредованы частичной потерей этой популяции эпителиальных клеток? В частности, работе показано, что органоиды, полученные из эпителия толстой кишки мышей, хорошо воспроизводят функцию эпителиального барьера в ходе культивирования *in vitro*. В то же время, для животных линии *Muc2*^{-/-} показано, что проницаемость их кишечного эпителия нарушена *in vivo*. Почему этот эффект не был подтвержден на уровне органоидов для мутантных животных?
- 2) В работе показано, что высокий исходный уровень *A. muciniphila* коррелирует с повышенной опухолевой нагрузкой, что несколько противоречит опубликованным данным о протективной роли в колите и некоторых метаболических заболеваниях. Нет ли такого, что *A. muciniphila* выступает не как «драйвер», а как маркер исходного состояния микробиоты, благоприятного для колонизации других патогенов, которые индуцируют опухоли. Можно ли предположить, что хронический дисбиоз может вызывать ремоделирование миелоидных клеток-предшественников костного мозга, что, в свою очередь, будет

модулировать воспалительный ответ (концепция тренированного иммунитета)?

- 3) Транскриптомный анализ и биоинформатические подходы, а именно - построение и валидация байесовской сети: почему был выбран именно такой дизайн анализа - сначала выявление дифференциально экспрессированных генов (DEGs), потом поиск генов со скоррелированной экспрессией (метод WGCNA) для DEGs, выбор именно 20 хаб-генов на модуль и именно такого числа генов в общей сети? Ведь создатели метода WGCNA прямо указывают на то, что он должен применяться к полным транскриптомным данным, а не только к дифференциально экспрессированным генам. Как эта модель ведет себя на других данных? Ведь в использованной в работе выборке всего 42 пациента, а для пациентов с ВЗК доступны и куда более обширные выборки в открытых источниках.
- 4) Протеомный анализ белкового комплекса клаудина-3. Важно отметить, что плотные контакты формируются только в апикальной части эпителиоцитов, а белок клаудин-3, судя по конфокальным снимкам, локализуется на всей латеральной мембране. В какой мере анализ белкового комплекса клаудина-3 отражает белковый состав его фракции именно в плотном контакте?

Заключение

Представленная диссертационная работа является самостоятельным и завершенным научным исследованием, посвященным одной из актуальных проблем современной молекулярной биологии — выяснению клеточных и метаболических механизмов нарушения проницаемости кишечного эпителия при хроническом воспалении. Автором проведен значительный по объему и разнообразию методических подходов цикл исследований, охватывающий

изучение эпителиального барьера, актинового цитоскелета, белков межклеточных контактов, липидного обмена, микробиоты, поведенческих нарушений и воспалительно-ассоциированного канцерогенеза.

Наиболее важные результаты работы связаны с доказательством того, что дестабилизация актинового цитоскелета служит общей характеристикой кишечного эпителия при хроническом воспалении различной этиологии. Существенную научную ценность имеют также данные о реорганизации белковых взаимодействий клаудина-3, накоплении церамидов в эпителии кишечника и частичной коррекции барьерной дисфункции при подавлении их синтеза. Полученные сведения создают основу для дальнейшего поиска молекулярных маркеров и мишеней, направленных на восстановление барьерной функции при воспалительных заболеваниях кишечника.

Следует отметить междисциплинарный характер исследования. В диссертации последовательно показана связь локальных изменений в эпителии кишечника с нарушениями системного метаболизма, состоянием кишечной микробиоты, особенностями поведения животных и восприимчивостью к воспалительно-ассоциированному колоректальному раку. Такой подход существенно расширяет представления о патогенезе ВЗК и подчеркивает перспективность комплексной оценки метаболических и микробиомных факторов.

Основные результаты исследования опубликованы в 25 статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в Scopus, Web of Science и РИНЦ, и представлены в 14 докладах на 10 научных конференциях различного уровня. Возможные замечания к работе имеют частный характер и не меняют общей высокой оценки проведенного исследования. Сформулированные автором выводы логичны, аргументированы и соответствуют содержанию диссертации.

Диссертационная работа Кожевниковой Елены Николаевны отвечает требованиям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335;

02.08.2016 г. №748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539). Автор диссертации, Кожевникова Елена Николаевна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. «Молекулярная биология».

Согласна на включение моих персональных данных в аттестационное дело, размещение в интернете и их дальнейшую обработку.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук (специальность 1.5.3 «Молекулярная биология»), профессор РАН, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

ДРУЦКАЯ Марина Сергеевна

Адрес места работы: 119991, Российская Федерация, Москва, г. Москва, ул. Вавилова, дом 32. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук. Тел.: +79166775130; e-mail: marinadru@gmail.com

«Подпись Друцкой М.С. заверяю»

Ученый секретарь

ИМР РАН, к.ф.-м.н.

11.09.2026



Коновалова Е.В.