

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Д.В. Юдкина на диссертационную работу Кожевниковой Елены Николаевны на тему «Метаболические и молекулярные механизмы регуляции эпителиальной проницаемости и системных нарушений, обусловленных воспалением кишечника», представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология

Актуальность диссертационной работы

Воспалительные заболевания кишечника представляют собой социально и клинически значимую группу хронических заболеваний, для которых характерны рецидивирующее течение, низкая эффективность терапии и высокий риск развития осложнений. Несмотря на интенсивное изучение болезни Крона и язвенного колита, многие звенья патогенеза этих заболеваний остаются не вполне понятными. В частности, требуют дальнейшего исследования механизмы, обеспечивающие нарушение целостности слизистого барьера кишечника и поддержание хронического воспалительного процесса. Эпителиальный барьер является не только физическим препятствием для проникновения микроорганизмов и их компонентов во внутреннюю среду организма, но и активной системой, регулирующей взаимодействия иммунной системы, кишечной микробиоты и метаболических процессов. Нарушение его структуры может способствовать транслокации бактериальных антигенов, усилению воспаления и развитию локальных и системных осложнений, включая поведенческие нарушения и ассоциированный с воспалением колоректальный рак. Всё это делает тему диссертационной работы Е.Н. Кожевниковой крайне актуальной. Автор анализирует эпителиальные, метаболические и микробиомные механизмы в их функциональной взаимосвязи. Такой подход представляется особенно актуальным, поскольку позволяет выявлять не только следствия воспаления, но и потенциальные звенья, доступные для молекулярной и метаболической коррекции.

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

Достоверность представленных в диссертационной работе Е.Н. Кожевниковой результатов не вызывает сомнений и обеспечивается: использованием моделей разной природы; использованием широкого спектра самых современных методов анализа клеточных структур, молекулярно-биологических и метаболомных исследований, а также функциональных экспериментов, с применением современного оборудования;

обширным объемом полученных экспериментальных данных, их детальным анализом и применением корректных статистических инструментов.

Автор сопоставляет данные, полученные на моделях хронического колита различной этиологии, модели AOM/DSS колоректального рака, кишечных органоидах и материале пациентов с язвенным колитом. Морфологические данные основаны на использовании световой, конфокальной и трансмиссионной электронной микроскопии с морфометрической оценкой межклеточных контактов, микроворсинок и митохондрий. Молекулярный и клеточный уровни исследования обеспечены методами иммуноблоттинга, иммуноокрашивания, анализа цитокинов, коиммунопреципитации и масс-спектрометрии. Высокая информативность работы обеспечена включением транскриптомного секвенирования, анализа коэкспрессионных сетей WGCNA, байесовского сетевого анализа, ЯМР-метабомики, ВЭЖХ-масс-спектрометрии и методов анализа микробиоты. Статистическая обработка выполнялась с применением параметрических и непараметрических методов, процедур множественного сравнения и специализированных биоинформатических алгоритмов.

Выводы и положения, выносимые на защиту, корректны и в полной мере отражают полученные результаты.

Достоверность результатов также подтверждается апробацией работы на десяти российских и международных научных мероприятиях. Результаты опубликованы в 25 статьях в изданиях из списка ВАК при Минобрнауки России для соискателей ученой степени доктора биологических наук.

Научная новизна

Научная новизна диссертации Е.Н. Кожевниковой определяется тем, что в ней впервые комплексно исследованы универсальные клеточные и молекулярные механизмы нарушения эпителиального барьера при хроническом воспалении кишечника и их связь с метаболическими и микробиомными факторами.

Впервые на нескольких независимых моделях хронического колита показано, что снижение количества филаментного актина представляет собой общее свойство воспаленного кишечного эпителия. Существенно, что это наблюдение получило подтверждение при исследовании биоптатов пациентов с язвенным колитом. Тем самым предложен новый универсальный признак эпителиальной дисфункции при хроническом воспалении кишечника.

Впервые экспериментально показано, что нарушение динамики актина способно вызывать дефекты локализации белков плотных и адгезивных контактов и увеличение проницаемости эпителия. Новыми являются сведения о перестройке интерактома клаудина-3 при хроническом колите и утрате его нормальных взаимодействий с актин-связывающими белками.

К числу новых результатов следует отнести выявление участия церамидов в нарушении структуры F-актина и эпителиального барьера. Впервые продемонстрирована возможность частичной коррекции барьерной дисфункции в условиях хронического воспаления кишечника путем фармакологического подавления синтеза церамидов.

Новизну имеют и результаты микробиомного блока работы. Автором впервые установлена положительная связь между исходной представленностью *A. muciniphila* и *B. acidifaciens* и последующим развитием воспалительного колоректального рака в экспериментальной модели. Полученные данные о роли микробиота-ассоциированных изменений метаболизма глицина и триптофана расширяют современные представления о молекулярных посредниках оси «микробиота–кишечник–мозг».

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационное исследование Е.Н. Кожевниковой изложено на 266 страницах машинописного текста. Рукопись содержит 36 рисунков и 3 таблицы. Библиографический список насчитывает 516 источников. Представленный объем и структура работы соответствуют характеру докторского диссертационного исследования и позволяют полно отразить результаты выполненного цикла исследований.

Структура работы соответствует общепринятой для докторских диссертаций и включает введение, обзор литературы, раздел с описанием материалов и методов, главы, содержащие результаты собственных исследований, обсуждение, выводы, список сокращений и список использованной литературы.

Во введении аргументирована актуальность исследования воспалительных заболеваний кишечника как системной патологии, связанной не только с хроническим воспалением слизистой оболочки, но и с нарушением эпителиального барьера, изменением метаболизма, дисбиозом, поведенческими расстройствами и повышенным риском колоректального рака. Обозначены цель и задачи работы, направленные на установление молекулярных и клеточных механизмов метаболической регуляции целостности кишечного эпителия, а также на выявление роли отдельных метаболитов и компонентов микробиоты в формировании внекишечных проявлений заболевания.

Здесь же раскрыты научная новизна и практическая значимость исследования: дестабилизация актинового цитоскелета рассматривается как универсальная характеристика хронического воспаления, а липидные метаболиты, аминокислотные пути и бактериальные таксоны – как потенциальные биомаркеры и терапевтические мишени.

Обзор литературы систематизирует современные представления о патогенезе воспалительных заболеваний кишечника, включая болезнь Крона и язвенный колит, их генетические, иммунные, микробные и метаболические предпосылки. Рассматриваются механизмы нарушения мукозального и эпителиального барьеров, роль белков плотных и адгезивных контактов, актинового цитоскелета, митохондриальной дисфункции и липидного состава мембран. Отдельное внимание уделено связи хронического воспаления с колоректальным канцерогенезом, а также оси «микробиота–кишечник–мозг», через которую микробные метаболиты могут влиять на нейромедиаторные системы, тревожноподобное и социальное поведение.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробное описание экспериментальных животных, клинического материала и этических аспектов исследования. Используются образцы пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, а также несколько моделей *in vivo*: генетически обусловленный колит у мышей *Muc2^{-/-}*, хронический DSS-индуцированный колит, модель адоптивного переноса Т-клеток и модель колоректального рака AOM/DSS. Методический аппарат включает гистологический и иммуногистохимический анализ, трансмиссионную электронную микроскопию, количественную ПЦР, транскриптомный и метаболомный анализ, иммуноблоттинг, иммунопреципитацию с протеомным анализом, оценку митохондриального дыхания, культивирование кишечных органоидов, секвенирование 16S рРНК и поведенческое фенотипирование. Такой уровень детализации обеспечивает воспроизводимость экспериментов и позволяет сопоставлять данные, полученные на разных биологических уровнях.

Основная часть работы включает несколько взаимосвязанных блоков результатов. В главе 3 показано, что при хроническом воспалении у мышей *Muc2^{-/-}* нарушаются межклеточные контакты, структура микроворсинок, организация актинового цитоскелета и функция митохондрий, что сопровождается снижением содержания АТФ и повышением проницаемости кишечника. Системно-биологический анализ позволил выделить потенциальные гены-регуляторы цитоскелетной перестройки, включая *PREX1*. В главе 4 детально охарактеризована роль F-актина в поддержании эпителиального барьера: показаны снижение его полимеризации, изменение локализации клаудинов, β -катенина и E-кадгерина, а также нарушение белковых взаимодействий клаудина-3 с актин-связывающими белками. Часть этих

изменений воспроизводится на разных моделях колита и подтверждаются в биоптатах пациентов с язвенным колитом.

В главе 5 раскрыта роль липидного метаболизма в формировании барьерной функции кишечника. Метаболомный анализ крипт толстой кишки выявил выраженные изменения сфинголипидов, прежде всего церамидов, а экспериментальное ингибирование их синтеза частично восстанавливало барьерную функцию. Показано также, что избыток фосфолипидов влияет на морфологию и дыхательную емкость митохондрий, но умеренное митохондриальное повреждение само по себе недостаточно для разрушения эпителиального барьера.

Главы 6 и 7 посвящены системным проявлениям хронического воспаления. На моделях *Muc2^{-/-}* и DSS-индуцированного колита показано, что микробиота и связанные с ней изменения метаболизма глицина и триптофана участвуют в регуляции тревожноподобного и социального поведения. В модели AOM/DSS установлено, что исходный состав микробиоты, в частности представленность *Akkermansia muciniphila* и *Bacteroides acidifaciens*, ассоциирован с восприимчивостью к воспалительному канцерогенезу и количеством опухолей толстой кишки.

В обсуждении результаты объединены в целостную концепцию, согласно которой хроническое воспаление кишечника сопровождается универсальными клеточными и метаболическими нарушениями эпителия, затрагивающими актиновый цитоскелет, межклеточные контакты, митохондрии и липидный обмен. В заключении и выводах суммированы основные положения работы, показана их связь с поставленными задачами и намечены перспективы дальнейшего изучения актин-регулирующих белков, сфинголипидного метаболизма и микробных маркеров как основы для диагностики, стратификации риска и разработки таргетной терапии воспалительных заболеваний кишечника.

Представленная диссертация написана логично. Рисунки полностью отражают полученные данные и позволяют не сомневаться в их достоверности. Выводы из проведенного исследования логичны и полностью соответствуют результатам.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации Е.Н. Кожевниковой полностью отражает содержание выполненной работы и основные её результаты. В нём последовательно представлены актуальность и степень разработанности рассматриваемой проблемы, сформулированы цели и задачи исследования, обозначены элементы научной новизны. В автореферате изложены положения, выносимые на защиту, а также дано краткое

обобщение полученных данных, что обеспечивает его полное соответствие содержанию диссертационной работы.

Вопросы и замечания по работе

Однако к представленной работе имеется ряд вопросов и замечаний:

1. На рис. 12А, Б и 13 непонятно, что такое интенсивность флуоресценции и как ее определяли, что являлось референсом. Почему не указано, что это именно интенсивность флуоресценции, а не разница в выдержке при получении изображений?

2. Не хватает обсуждения вопроса о том, может ли фумонизин-1 быть потенциальным терапевтическим агентом.

3. В главе 6 указано: «до 35-40% пациентов с ВЗК страдают от тревожности, и до 22-25% – от депрессии». Насколько эта доля выше, чем распространенность тех же симптомов у людей без ВЗК?

4. Насколько мышинная модель ВЗК является адекватной для оценки психоэмоциональных нарушений у пациентов с ВЗК?

5. Почему при добавлении в питье мышей амоксициллина в комбинации с клавулановой кислотой (АМС) исследовали содержание только *Akkermansia muciniphila*? Антибиотик широкого спектра действия должен был привести к полному изменению состава микробиоты. В целом в разделе 6.1.2 непонятно, почему внимание заострено именно на этом виде бактерий, поскольку антибиотикотерапия очевидно меняет весь состав микробиома кишечника.

Высказанные вопросы и замечания не являются принципиальными, не снижают значимости представленной работы и не оказывают влияния на ее положительную оценку.

Заключение

Диссертационное исследование Е.Н. Кожевниковой на тему «Метаболические и молекулярные механизмы регуляции эпителиальной проницаемости и системных нарушений, обусловленных воспалением кишечника» является законченной научно-квалификационной работой, в которой сформулированы научные положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, имеющее большое теоретическое и практическое значение в молекулярной биологии.

По актуальности избранной темы, научной новизне, степени обоснованности и достоверности полученных результатов, глубине проведенного анализа, объему

выполненной работы и значимости сформулированных выводов диссертация Е. Н. Кожевниковой соответствует 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), предъявляемым к докторским диссертациям. Соискатель Е.Н. Кожевникова заслуживает присуждения искомой степени по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

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

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, заведующий лабораторией генотерапии Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет)

Юдкин Дмитрий Владимирович

01.09.2026



Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Почтовый индекс: 119048. Адрес: г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

e-mail университета: rectorat@staff.sechenov.ru, тел.: 8 (499)248-53-83

Сайт университета: <https://www.sechenov.ru/>