



**МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
(МГУ)**

Ленинские горы, Москва,
ГСП-1, 119991
Телефон: 939-10-00
Факс: 939-01-26

09.09.2026 № 400-26/013-03

На № _____

Утверждаю

Проректор – начальник

Управления научной политики

МГУ имени М.В. Ломоносова

Федянин Андрей Анатольевич

« ____ » _____ 2026 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Кожевниковой Елена Николаевны на тему
«МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭПИТЕЛИАЛЬ-
НОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ И СИСТЕМНЫХ НАРУШЕНИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ ВОСПА-
ЛЕНИЕМ КИШЕЧНИКА»

представленной к защите на соискание ученой степени

доктора биологических наук

по специальности 1.5.3. - Молекулярная биология

Диссертация 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 изучению механизмов нарушения кишечного барьера при хроническом воспалении, а также системных последствий такого рода нарушений.

Актуальность темы выполненной работы.

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), к которым относятся язвенный колит и болезнь Крона, представляют собой хронические воспалительные заболевания со сложным

многофакторным патогенезом. В развитие ВЗК вносят вклад генетическая предрасположенность, нарушение регуляции иммунного ответа, изменение состава и функций кишечной микробиоты, а также нарушение целостности эпителиального барьера. При этом до конца не установлено, какие из выявляемых изменений являются причиной развития воспаления, а какие возникают вторично и способствуют поддержанию хронического воспалительного процесса.

Эпителиальные клетки кишечника формируют физический барьер между организмом и микробиотой и ее продуктами, находящимися в просвете кишечника. Поэтому нарушение межклеточных контактов и увеличение проницаемости эпителия способствуют взаимодействию компонентов микробиоты с клетками иммунной системы и может вызывать или поддерживать воспалительный процесс. Важную роль в поддержании структуры эпителиальных клеток и межклеточных контактов играет актиновый цитоскелет. Кроме этого, состояние эпителиальных клеток зависит от их метаболизма и функции митохондрий. Таким образом, нарушение этих процессов может быть одним из механизмов, связывающих хроническое воспаление с изменением барьерной функции кишечника.

Стоит также отметить, что последствия хронического воспаления кишечника не ограничиваются локальными изменениями. Изменение состава микробиоты и продукции микробных и клеточных метаболитов потенциально может влиять на другие органы и системы. Отдельный интерес в данном контексте представляет связь кишечного воспаления с работой центральной нервной системы, что может приводить к изменениям в поведении, а также к повышенному риску развития колоректального рака.

Таким образом, работа Е.Н. Кожевниковой по изучению молекулярных механизмов нарушения эпителиального барьера при хроническом воспалении кишечника, а также роли метаболизма и микробиоты в развитии данной патологии является актуальной задачей.

Основные научные результаты, полученные автором в работе.

В первой части работы изучались изменения кишечного эпителия при хроническом воспалении. Для этого были использованы несколько экспериментальных мышинных моделей, включая генетическую (делеция *Muc2*), колит, индуцированный DSS и колит, вызываемый адоптивным переносом Т лимфоцитов. Во всех исследованных моделях было обнаружено, что индукция воспаления приводила к снижению содержания F-актина в эпителиальных клетках кишечника. Сходные изменения также были обнаружены при анализе биоптатов нескольких пациентов с язвенным колитом.

Снижение F-актина сопровождалось нарушением локализации других белков, участвующих в формировании межклеточных контактов. В частности, были выявлены изменения локализации клаудина-3, клаудина-7, E-кадгерина и β -катенина. Кроме этого, при хрониче-

ском воспалении были обнаружены изменения структуры межклеточных контактов и микроворсинок, а также митохондрий эпителиальных клеток. Таким образом, полученные результаты указывают на связь между нарушением организации актинового цитоскелета и барьерной функции эпителия.

Для поиска молекулярных регуляторов этих изменений был проведен анализ опубликованных транскриптомных данных. Сравнение транскриптомных данных, полученных в экспериментальной модели колита и у пациентов с болезнью Крона, выявило белок PREX1 как один из потенциальных регуляторов динамики актинового цитоскелета. При этом стоит отметить, что функциональная роль PREX1 непосредственно в данной работе дальше не исследовалась.

Для дальнейшего понимания механизма был проведен анализ белков, взаимодействующих с клаудином-3 в норме и при воспалении. Коиммунопреципитация и последующий масс-спектрометрический анализ выявили, что при хроническом воспалении изменяется состав белковых комплексов клаудина-3. В частности, снижается его взаимодействие с рядом актин-связывающих белков, включая α -актинин, эзрин, винкулин и компоненты комплекса связи между межклеточными контактами и актиновым цитоскелетом при воспалении.

На следующем этапе работы был проведен анализ связи метаболизма с барьерными функциями эпителия при хроническом воспалении. Первичный анализ липидного состава крипт толстого кишечника выявил изменение сфинголипидного обмена и накопление церамидов и гликосфинголипидов у мышей с делецией *Muc2*. Ингибирование синтеза церамидов у мышей этой линии приводило к частичному восстановлению F-актина, локализации β -катенина и клаудина-7 и снижению проницаемости кишечника. Таким образом, полученные результаты указывают на участие сфинголипидного метаболизма в регуляции барьерной функции кишечного эпителия.

Отдельная часть диссертационной работы посвящена системным изменениям, сопровождающим хроническое воспаление кишечника, а именно изменениям поведения животных при хроническом колите. В модели с нокаутом гена *Muc2* автором был проведен ряд поведенческих тестов и показано, что у мышей данной линии наблюдаются гиперактивность, тревожное поведение и изменения социального поведения. Для оценки вклада микробиоты в данный фенотип содержание *A. muciniphila* увеличивали с помощью различных антибиотиков, что, в свою очередь, приводило к изменениям поведения мышей. Кроме этого, с использованием ингибиторов GlyR и NMDAR была показана роль глицин-зависимой нейротрансмиссии в формировании части выявленных поведенческих нарушений. Наконец, в модели DSS-колита был проведен метаболомный анализ сыворотки и выявлена связь изменений метаболизма триптофана с нарушениями социального поведения.

В последней части диссертационной работы автор изучала вклад микробиоты в развитие рака, ассоциированного с воспалением. Для этого была использована модель AOM/DSS. Сначала были сравнены две колонии мышей C57BL/6, различавшиеся по исходному составу кишечной микробиоты. Секвенирование микробиоты до индукции канцерогенеза показало, что исходное содержание *Akkermansia muciniphila* и *Bacteroides acidifaciens* положительно коррелировало с количеством опухолей, а также с выраженностью воспалительных изменений в дальнейшем. Таким образом, в работе была выявлена связь исходного состава кишечной микробиоты с последующей восприимчивостью животных к воспалительно-ассоциированному канцерогенезу.

Новизна исследования и полученных результатов

В данной работе впервые было показано снижение содержания F-актина в эпителии кишечника в нескольких моделях хронического воспаления различной природы. Сходные изменения были обнаружены также в биоптатах пациентов с язвенным колитом. Кроме этого, с использованием кишечных органоидов было показано, что фармакологическое изменение полимеризации актина влияет на локализацию белков межклеточных контактов и проницаемость эпителия.

Новыми являются также результаты анализа белковых комплексов клаудина-3. Было показано, что хроническое воспаление сопровождается изменением его взаимодействия с белками, регулирующими актиновый цитоскелет. Эти данные позволяют предложить один из возможных молекулярных механизмов нарушения связи между актиновым цитоскелетом и межклеточными контактами.

Другим новым результатом является выявление связи между изменением сфинголипидного метаболизма и нарушением барьерной функции кишечника. Автором показано накопление церамидов при хроническом воспалении, тогда как ингибирование их синтеза частично восстанавливало структуру F-актина и барьерную функцию *in vivo*.

Помимо этого, в работе получены данные о связи исходного состава кишечной микробиоты с восприимчивостью к воспалительно-ассоциированному канцерогенезу. В частности, содержание *A. muciniphila* и *B. acidifaciens* до индукции AOM/DSS было ассоциировано с последующим развитием опухолевого процесса.

Наконец, установлена связь микробиоты, метаболизма глицина/триптофана с поведенческими изменениями при хроническом воспалении кишечника.

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

Основные положения диссертационной работы подтверждаются результатами, полученными с использованием нескольких независимых экспериментальных подходов. В част-

ности, уменьшение F-актина в эпителии наблюдалось в нескольких мышинных моделях хронического колита, а также в биопсийном материале пациентов. Для последующего исследования взаимодействий клаудина-3 с белками использовались коиммунопреципитация и масс-спектрометрический анализ в норме и при колите, что позволило определить комплексы белков, образующиеся в том или ином случае. Для определения связи между динамикой актина и состоянием межклеточных контактов также были проведены опыты на кишечных органоидах, которые подтвердили, что F-актин участвует в регуляции проницаемости эпителия.

Связь метаболизма и воспаления была проанализирована как путем определения липидного состава, так и в экспериментах с ингибированием синтеза церамидов *in vivo*.

Для изучения системных последствий хронического воспаления автором были использованы анализ состава микробиоты, определение метаболитов, поведенческие тесты и модель воспалительно-ассоциированного канцерогенеза. Таким образом, большинство основных положений работы основано на результатах, полученных несколькими методами.

При этом часть выявленных связей, прежде всего относящихся к PREX1, микробиоте и системным эффектам воспаления, требует дальнейшего функционального подтверждения.

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций

Достоверность обеспечивается использованием широкого спектра современных методов молекулярной и клеточной биологии. Так, автором применялись световая, конфокальная и электронная микроскопия, иммуногистохимический анализ, Вестерн-блоттинг, коиммунопреципитация и масс-спектрометрия. Метаболические изменения исследовали с использованием ЯМР-спектроскопии и ВЭЖХ-масс-спектрометрии. Для анализа транскриптомных данных использовались секвенирование РНК, WGCNA и анализ байесовских сетей. Состав кишечной микробиоты исследовался методом секвенирования 16S rRNA и последующего биоинформатического анализа. Важным преимуществом работы является использование нескольких мышинных моделей хронического воспаления кишечника, кишечных органоидов, модели рака, ассоциированного с воспалением, AOM/DSS, а также биопсийного материала пациентов. Использование различных моделей позволяет определить общие изменения эпителиального барьера, воспроизводимые при хроническом воспалении различной природы.

Корректность статистических выводов подтверждается применением параметрических и непараметрических критериев, поправок на множественные сравнения и биоинформатических методов, соответствующих характеру анализируемых данных. Значимость работы подтверждается публикацией ее результатов в 25 статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в Scopus, Web of Science и РИНЦ, а также апробацией на 10 российских и международных научных мероприятиях, где было представлено 14 докладов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 266 страницах и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа содержит 36 рисунков и 3 таблицы. Список литературы включает 516 источников.

Оценка содержания диссертационной работы

Основная часть работы посвящена нарушению организации кишечного эпителия, актинового цитоскелета и межклеточных контактов. Далее исследуется вклад метаболических изменений, прежде всего сфинголипидного обмена, в нарушение барьерной функции кишечника. Отдельные главы посвящены связи хронического воспаления с изменениями микробиоты, метаболизма и поведения, а также роли исходного состава микробиоты в восприимчивости к воспалительно-ассоциированному канцерогенезу.

Стоит отметить широкий набор экспериментальных подходов, использованных в работе. Автор сочетает экспериментальные модели хронического воспаления с анализом кишечных органоидов и биопсийного материала пациентов, а классические методы молекулярной и клеточной биологии — с транскриптомным, метаболомным и микробиомным анализом.

В целом полученные результаты имеют фундаментальное значение для понимания молекулярных и метаболических механизмов нарушения эпителиального барьера при хроническом воспалении кишечника. Работа соответствует специальности 1.5.3. «Молекулярная биология».

Тем не менее при анализе диссертационной работы возник ряд вопросов и замечаний:

1. Одним из центральных положений диссертационной работы является представление о снижении содержания и нарушении организации F-актина как общей характеристике кишечного эпителия при хроническом воспалении. Вместе с тем исследование клинического материала включает биоптаты трех пациентов с язвенным колитом и двух условно здоровых доноров. Пациенты различаются по активности и длительности заболевания и получают различную противовоспалительную, иммуносупрессивную и биологическую терапию. В какой степени, по мнению автора, результаты, полученные на такой пилотной выборке, могут быть экстраполированы на ВЗК человека в целом и насколько проводимая терапия могла влиять на исследуемые характеристики эпителия?

2. В некоторых экспериментальных сериях использовано небольшое число животных, в частности $n=3$ на группу в экспериментах с ректальным введением фармакологических ингибиторов, тогда как количественный морфометрический анализ включает большое число измерений отдельных клеток или участков ткани. В связи с этим хотелось бы уточнить, что принималось за независимую экспериментальную единицу при статистическом анализе и каким образом учитывалась вложенность отдельных морфометрических измерений в пределах одного животного. Не возникает ли в данном случае риск псевдорепликации? Тот же вопрос

относится к статистическому анализу биопсий пациентов и здоровых доноров, где число независимых биологических образцов также невелико.

3. На основании интегративного анализа транскриптомных данных PREX1 выделен в качестве потенциального регулятора динамики актинового цитоскелета при хроническом воспалении. Однако непосредственная функциональная роль PREX1 в эпителии кишечника экспериментально не исследована. Какие дополнительные данные необходимы, по мнению автора, для подтверждения причинной роли PREX1 и чем обусловлен выбор именно этого кандидата среди других генов, выявленных при сетевом анализе?

4. Для оценки роли сфинголипидного метаболизма использован фумонизин B1, ингибирующий церамидсинтазы. Вместе с тем фумонизин B1 является биологически активным микотоксином с рядом дополнительных клеточных эффектов. В какой степени наблюдаемое восстановление организации F-актина и барьерной функции можно специфически связать со снижением синтеза церамидов? Какие генетические или более селективные фармакологические подходы могли бы подтвердить данный механизм?

5. В модели AOM/DSS установлена ассоциация исходной представленности ных к воспалительно-ассоциированному канцерогенезу. При этом сравнивались животные двух субколоний, различавшихся по общему составу кишечной микробиоты. Поэтому представляется важным разграничить прогностическую ассоциацию и непосредственную причинную роль конкретных микроорганизмов. Какие эксперименты — перенос микробиоты, контролируемая колонизация, использование гнотобиотических животных или другие подходы — автор считает необходимыми для доказательства функциональной роли указанных бактериальных видов?

6. В работе большое внимание уделяется оси «микробиота–кишечник–мозг», и предлагается связь между изменениями микробиоты, метаболизма аминокислот и поведенческим фенотипом животных. Вместе с тем хроническое воспаление и дефицит Muc2 сами по себе могут оказывать системное действие и влиять на метаболизм и функцию центральной нервной системы. Какие звенья предполагаемой последовательности «микробиота → метаболит → ЦНС → поведение» непосредственно подтверждены функциональными экспериментами, а какие следует рассматривать преимущественно как ассоциативные? Планируется ли дальнейшая пертурбация экспериментальной системы для установления механизма?

7. Поведенческие изменения рассматриваются как одно из системных последствий хронического воспаления кишечника. При этом на результаты поведенческих тестов потенциально могут влиять тяжесть воспаления, общее состояние животных, изменение массы тела, стресс и другие неспецифические факторы. Каким образом в работе контролировалось

влияние этих факторов и насколько выявленный поведенческий фенотип можно считать специфически связанным с исследованными метаболическими и микробиота-зависимыми механизмами?

8. Значительная часть экспериментальных исследований выполнена преимущественно на самцах мышей. Между тем пол может существенно влиять на иммунные реакции, метаболизм, состав кишечной микробиоты и поведение. Чем обусловлен преимущественный выбор самцов и насколько, по мнению автора, полученные результаты могут быть экстраполированы на животных женского пола?

9. Литературный обзор содержит значительный объем информации и охватывает основные направления патогенеза воспалительных заболеваний кишечника. Вместе с тем в ряде его разделов недостаточно полно представлены результаты исследований последних пяти лет. За этот период существенно расширились представления о молекулярной иммунологии ВЗК, цитокиновых сетях, регуляции эпителиального барьера, взаимодействии иммунной системы с микробиотой и молекулярной гетерогенности заболевания. В связи с этим некоторые разделы обзора преимущественно отражают ранее сформировавшиеся концепции и могли бы быть дополнены более современными данными.

10. Отдельного уточнения требует изложение роли врожденного иммунитета и генетической предрасположенности в развитии ВЗК. В частности, роль Toll-подобных рецепторов местами представлена преимущественно в контексте провоспалительной активации NF- κ B и продукции цитокинов. Такое описание представляется несколько упрощенным, поскольку TLR-сигналинг в кишечнике является контекст- и клеточно-зависимым и наряду с провоспалительными эффектами участвует в поддержании гомеостаза эпителия, регенерации и взаимодействии с комменсальной микробиотой. Кроме этого, раздел о генетической предрасположенности в основном ограничен классическими генами NOD2, ATG16L1, IRGM и IL23R. За последние годы получено большое количество данных о полигенной природе ВЗК и взаимодействии генетических факторов с иммунной системой, эпителием и микробиотой, которые практически не обсуждаются в обзоре.

Мелкие замечания:

В тексте диссертации имеются неточности. В частности, обозначения интерлейкинов во многих случаях приводятся без дефиса (IL1 β , IL6, IL10, IL12, IL17A, IL22, IL23 вместо IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, IL-22, IL-23); непоследовательно используются обозначения TNF/TNF- α и IFN γ /IFN- γ . Указанные замечания преимущественно носят редакционный характер и не влияют на общую оценку научной значимости диссертационной работы.

Данные вопросы и замечания не ставят под сомнение основные экспериментальные результаты диссертационной работы. Вместе с тем они указывают на необходимость более

осторожного разграничения ассоциативных и причинно-следственных связей при интерпретации отдельных результатов, учета ограничений экспериментального дизайна и более полного отражения современного состояния литературы по молекулярным механизмам воспалительных заболеваний кишечника.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней

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», представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, в которой получен ряд новых результатов, имеющих фундаментальное значение для понимания механизмов хронического воспаления кишечника.

В работе показано, что хроническое воспаление кишечника сопровождается нарушением организации актинового цитоскелета эпителиальных клеток и изменением локализации белков межклеточных контактов. Получены новые данные об изменении взаимодействия клаудина-3 с актин-связывающими белками и участии сфинголипидного метаболизма в нарушении барьерной функции эпителия. Кроме этого, исследована связь кишечной микробиоты и метаболических изменений с системными последствиями хронического воспаления, включая изменение поведения животных и восприимчивость к воспалительно-ассоциированному канцерогенезу.

Данная работа содержит большое количество экспериментов и использует различные экспериментальные модели хронического воспаления кишечника у мышей. Помимо этого, в данной работе используется большой спектр современных методов молекулярной и клеточной биологии.

Основные результаты работы опубликованы в 25 статьях в рецензируемых научных изданиях и представлены на российских и международных научных конференциях.

Высказанные вопросы и замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы. При этом часть из этих вопросов касается лишь ограничений экспериментального дизайна и необходимости дальнейшего изучения наблюдаемых эффектов, а замечания к литературному обзору и оформлению текста носят преимущественно редакционный характер и не влияют на общую оценку работы.

По актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и значимости полученных результатов диссертация Кожевниковой Елены Николаевны соответствует требова-

ниям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. «Молекулярная биология».

Отзыв рассмотрен и утвержден на семинаре Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова от 1 сентября 2026 года, протокол №9.

Отзыв на диссертационную работу составил кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунологии Андрей Алексеевич Круглов, кандидат биологических наук по специальности 03.00.03 — молекулярная биология.

И.о. директора НИИ ФХБ
имени А.Н.Белозерского МГУ,
член-корреспондент РАН, д.х.н., профессор

Тел.: +7 (495) 939-53-59;
e-mail: petya@belozerky.msu.ru



П.В. Сергиев