

Кожевникова Елена Николаевна

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

1.5.3 Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Новосибирск - 2026

Работа выполнена в лаборатории моделирования патологий человека и лаборатории клеточного деления Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН и в лаборатории генетики лабораторных животных Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН».

**Официальные
оппоненты:**

Григорьева Эльвира Витальевна, доктор биологических наук, руководитель лаборатории гликобиологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (г. Новосибирск)

Друцкая Марина Сергеевна, доктор биологических наук, профессор РАН, руководитель лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН Института молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН (г. Москва)

Юдкин Дмитрий Владимирович, доктор биологических наук, руководитель лаборатории генотерапии, Институт регенеративной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (г. Москва)

**Ведущая
организация:**

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, г. Москва)

Защита диссертации состоится 05 октября 2026 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.082.01, созданного на базе ФГБУН Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 8/2, т.(383) 373-02-49. E-mail: ovant@mcb.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИМКБ СО РАН и на сайте Института: <https://www.mcb.nsc.ru/>
Автореферат разослан «__» «_____» 2026 г

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук О. В. Антоненко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), такие как болезнь Крона и язвенный колит, представляют собой хронические рецидивирующие патологии со сложной, многофакторной этиологией. ВЗК характеризуются усилением воспалительных иммунных реакций в мукозальном слое кишечника, что приводит к инфильтрации иммунных клеток в слизистый и подслизистый слои, нарушению структуры эпителиальной ткани и снижению барьерных свойств эпителия. ВЗК демонстрируют неуклонный рост заболеваемости во всем мире и наиболее часто встречаются в развитых индустриализированных странах. В Северной Америке и Западной Европе распространенность ВЗК составляет более 0,3%, тогда как в России она оценивается в 0,03%. Отсутствие своевременной диагностики ВЗК приводит к ухудшению прогноза, усиливает тяжесть течения заболеваний, в результате чего увеличивается частота хирургического лечения и инвалидизации пациентов.

Несмотря на большой интерес к этим заболеваниям, полное излечение достигается лишь у небольшой части пациентов. Современные исследования все чаще указывают на критическую роль системных и кишечных метаболических изменений в развитии ВЗК, включая нарушения липидного и энергетического обмена, дисбаланс биосинтеза аминокислот и желчных кислот. Одним из ключевых аспектов ВЗК является нарушение кишечного эпителиального барьера, которое приводит к транслокации микробных антигенов в слизистый и подслизистый слои кишечника, поддержанию воспалительных реакций и формированию системных осложнений. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе нарушения барьерной функции кишечника, в особенности на фоне хронического воспаления, остаются недостаточно изученными. Выявление основных метаболических путей и отдельных метаболитов, влияющих на целостность эпителиального барьера кишечника, открывает новые перспективы для разработки таргетной терапии ВЗК. Нарушения метаболизма, характерные для ВЗК, также связывают с развитием сопутствующих расстройств. Предполагается, что нарушения системного метаболизма на фоне хронического воспаления кишечника и ассоциированной с ним микробиоты также могут участвовать в патогенезе сопутствующих (коморбидных) состояний, включая колоректальный рак и нарушения со стороны центральной нервной системы, такие как тревожность и депрессия.

Ввиду ограниченной изученности молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе развития ВЗК, и отсутствия единой этиологии этих заболеваний, современные терапевтические подходы сводятся преимущественно к применению противовоспалительных и иммуносупрессивных препаратов. В результате выполнения настоящего исследования сформулирована гипотеза о том, что при ВЗК формируются

сходные клеточные и метаболические нарушения эпителия кишечника вне зависимости от этиологии воспалительного процесса. В связи с этим основное внимание в исследовании уделено выявлению молекулярных и клеточных характеристик ВЗК, общих для различных этиологических вариантов заболевания. Для решения этой задачи применялся комплексный подход с использованием различных экспериментальных моделей *in vivo* и образцов от пациентов с диагнозом «ВЗК», что позволяет отделить универсальные механизмы тканевого повреждения от специфических для конкретной этиологии реакций.

В данной работе показано, что общей характеристикой эпителия при хроническом колите является нарушение динамики полимеризации актинового цитоскелета, что сопряжено с дисфункцией межклеточных контактов и нарушением эпителиального барьера. На молекулярном уровне это нарушение ассоциировано с изменением профиля белок-белковых взаимодействий актина и белка плотных контактов клаудина-3, что выявляет новые мишени для коррекции барьерной функции кишечника вне зависимости от этиологии воспаления. Развивая этот подход, в работе проанализирован метаболический профиль кишечного эпителия при хроническом воспалении. Показано, что метаболические изменения эпителия ассоциированы с нарушениями межклеточной коммуникации и определяют системный характер ВЗК, включая коморбидные расстройства. Выявление ключевых метаболитов и сигнальных путей позволяет рассматривать метаболическую регуляцию как механизм, связывающий локальное повреждение кишечника с системными проявлениями заболевания.

В этом контексте использование экспериментальных моделей приобретает двойную роль. Они позволяют не только воспроизводить ключевые признаки ВЗК и оценивать эффективность потенциальных терапевтических агентов, но и служат физиологически значимыми моделями для изучения молекулярных механизмов взаимодействия иммунной системы, микробиоты кишечника, метаболических путей и центральной нервной системы.

Цель исследования: установление молекулярных и клеточных механизмов метаболической регуляции целостности кишечного эпителия и выявление роли отдельных метаболитов и ассоциированных с ними компонентов кишечной микробиоты в регуляции поведения и восприимчивости к колоректальному раку на модельных животных.

Задачи исследования:

1. Изучить ультраструктурную организацию кишечного эпителия в норме и при хроническом воспалении и провести предсказательный анализ генов-регуляторов, обеспечивающих структурную целостность эпителия, с использованием модели хронического воспаления кишечника на мышах и данных от пациентов с болезнью Крона.
2. Идентифицировать общие клеточные характеристики реорганизации

кишечного эпителия на моделях хронического кишечного воспаления различной этиологии на лабораторных животных.

3. Выявить ключевые метаболические пути и отдельные метаболиты, обеспечивающие барьерную функцию кишечника в норме и при воспалении, с использованием интегративного транскриптомного и метаболомного анализа.
4. Оценить роль исходной микробиоты кишечника в модуляции восприимчивости к колоректальному раку и определить потенциальные бактериальные маркеры канцерогенеза.
5. Охарактеризовать механизмы, опосредующие влияние кишечной микробиоты и метаболитов, ассоциированных с хроническим воспалением кишечника, на нейромедиаторные пути центральной нервной системы и поведение с использованием модельных животных.

Научная новизна и практическая ценность. Научная новизна работы определяется получением новых фундаментальных знаний о механизмах нарушения кишечного барьера и системных эффектах при хроническом воспалении. В частности, впервые на нескольких моделях *in vivo* и в биоптатах эпителия кишки пациентов с язвенным колитом показано, что общей клеточной характеристикой эпителия кишечника при хроническом воспалении является дестабилизация актинового цитоскелета. С использованием клеточной модели органоидов кишечника и моделей *in vivo* установлено, что нарушение баланса полимерного и мономерного актина вызывает дисфункцию межклеточных контактов и снижает количество ключевых белков плотных и адгезивных контактов на плазматической мембране. Для одного из белков плотных контактов, клаудина-3, впервые методом ко-иммунопреципитации с последующей масс-спектрометрией охарактеризован профиль белковых взаимодействий в норме и на модели хронического колита *in vivo*. Показано, что при воспалении нарушается тесная связь клаудина-3 с сетью актин-связывающих белков, что имеет ключевое значение для развития клеточных дефектов эпителиального барьера.

Полученные результаты устанавливают связь метаболизма липидов и аминокислот с локальными и внекишечными проявлениями ВЗК. Так, показана роль церамидов в формировании цитоскелета и межклеточных контактов. Данный результат позволяет предположить новые механизмы участия сфинголипидов в поддержании эпителиального барьера. Кроме того, представленная работа содержит экспериментальное подтверждение ассоциации микробиота-зависимого метаболизма аминокислот с регуляцией поведения и функций ЦНС, углубляя понимание основ взаимодействия «микробиота-кишечник-мозг». Выявление потенциальной предсказательной роли пропионат-продуцирующих бактерий в отношении канцерогенеза позволяет предложить новые критерии для стратификации пациентов по риску развития колоректального рака.

Настоящее исследование расширяет фундаментальные представления о патогенезе ВЗК и выявляет новые молекулярные мишени для направленной терапии. В частности, выявление дестабилизации актинового цитоскелета эпителиоцитов как консервативной, этиологически независимой характеристики ВЗК представляется одним из ключевых системных обобщений данной работы. Оно позволяет объяснить молекулярные механизмы нарушения барьерных свойств эпителия при различной этиологии воспаления и рассматривать актиновый цитоскелет как центральное звено патогенеза ВЗК. С использованием методов системной биологии ген *PREX1* был предсказан в качестве одного из потенциальных регуляторов динамики полимеризации актина в условиях хронического воспаления. Это дает теоретическую основу для проверки роли факторов обмена гуаниновых нуклеотидов в нарушении целостности эпителия при воспалении.

Практическая значимость работы заключается в потенциальной применимости полученных результатов в клинической практике. Белки-регуляторы динамики актина, специфические церамиды и ферменты их биосинтеза, а также отдельные бактериальные таксоны представляются перспективными биомаркерами. Они могут быть рассмотрены для использования в ранней диагностики, оценки характера течения ВЗК и риска развития сопутствующих расстройств. Кроме того, работа выявляет новые потенциальные мишени для таргетной фармакологической терапии. Модуляторы активности актин-связывающих белков, ингибиторы синтеза церамидов, а также метаболические препараты на основе аналогов глицина или модуляторов метаболизма триптофана открывают возможности для создания новых классов лекарственных средств.

Данное исследование указывает на целесообразность оценки психоневрологического статуса в рамках стандартного мониторинга пациентов с ВЗК, более пристального внимания к исходному составу микробиоты как к фактору индивидуального риска, а также использования глубокого метаболического и микроскопического исследования биоптатов, что в целом формирует интегративный подход к изучению патогенеза ВЗК.

Положения, выносимые на защиту:

1. Снижение количества филаментного актина является универсальной клеточной характеристикой эпителия в условиях хронического воспаления кишечника. Изменение динамики полимеризации актина обуславливает нарушение плотных и адгезивных контактов и повышение проницаемости кишечного эпителия.
2. Нарушение регуляции актинового цитоскелета при хроническом воспалении кишечника ассоциировано с изменением профиля его белковых взаимодействий, в частности, с диссоциацией белка плотных контактов клаудин-3 и актин-связывающих белков.
3. Нарушение регуляции метаболизма сфинголипидов в кишечном эпителии

ассоциировано с воспалением, дестабилизацией актинового цитоскелета и нарушением функции эпителиального барьера. Ингибирование синтеза церамидов частично восстанавливает барьерную функцию.

4. Исходный состав микробиоты кишечника, в частности, количество *Akkermansia muciniphila* и *Bacteroides acidifaciens*, ассоциировано с повышенной восприимчивостью к воспалительному канцерогенезу в химически индуцируемой модели колоректального рака.
5. Хроническое воспаление кишечника ассоциировано со специфическими изменениями микробиоты, которые через модуляцию метаболизма триптофана и глицина влияют на социальное и тревожноподобное поведение.

Апробация работы. За последние пять лет основные результаты диссертации были представлены в 14 докладах на 10 международных и всероссийских научных конференциях, в том числе: III Всероссийской конференции «Внутриклеточная сигнализация и метаболизм, транспорт, цитоскелет» (Санкт-Петербург, 2026), II Всероссийской конференции с международным участием «Самойловские чтения» (Казань, 2026), 12th World Congress on Targeting Microbiota (Валенсия, Испания, 2025), IV Международной научной конференции «Future of Biomedicine 2025» (Владивосток, 2025), 20-й Юбилейной всероссийской конференции с международным участием «Проблема инфекции при критических состояниях» (Москва, 2025), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Учение академика И.П. Павлова в современной системе нейронаук» (Санкт-Петербург, 2024), II Российской конференции «Заболевания мозга – вызов XXI века» (Казань, 2024; два доклада), VI международной научной конференции «Микробиота человека и животных» (Санкт-Петербург, 2024), Международной мультikonференции BGRS/SB-2024 (Новосибирск, 2024; три доклада), 27-й Пущинской школе-конференции «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2024), а также на Девятой конференции специалистов по лабораторным животным в Сколтехе (Москва, 2021).

Вклад автора. В цикле исследований, составляющих диссертационную работу, автору принадлежит решающая роль в выборе направления исследований, постановке задач, разработке дизайна эксперимента. Также автор участвовал в проведении всех экспериментов, подготовке образцов и биоинформатическом и статистическом анализе полученных данных, их интерпретации, обобщении и публикации. Метаболомный и транскриптомный анализы выполнялись на базе центров коллективного пользования и в коммерческих организациях. В работах, опубликованных в соавторстве, личный вклад автора заключается в участии на всех этапах: от подготовки биологического материала и контроля качества образцов до обработки первичных данных, их анализа, формулировки выводов и оформления результатов.

Благодарности. Автор благодарит Борисову М.А., к.б.н. Морозову М.В. и к.б.н. Литвинову Е.А. за совместную работу по оценке поведенческих фенотипов, к.б.н. Ачасову К.М. и к.б.н. Попову Ю.В. за совместную работу по созданию сложных моделей *in vivo* и анализ данных, к.б.н. Медведеву С.С., к.б.н. Огиенко А.А., к.б.н. Морозову К.Н. и к.б.н. Киселеву Е.В. за совместную работу по оценке морфологии тканей и локализации белков с помощью конфокальной и электронной микроскопии, к.х.н. Снытникову О.А. и д.х.н. Центаловича Ю.П. за совместную работу по анализу метаболомных профилей тканей и крови с помощью ЯМР-спектроскопии, к.м.н. Кулыгину Ю.А. и д.м.н. Осипенко М.Ф. за совместную работу с образцами биопсии пациентов, а также весь коллектив соавторов за помощь и сотрудничество при проведении настоящей работы. Автор выражает глубокую признательность академику, д.б.н. Игорю Федоровичу Жимулеву и д.б.н. Сергею Анатольевичу Демакову за наставничество при подготовке диссертации. Автор сердечно благодарит всю свою семью за многолетнюю поддержку, любовь и помощь.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 266 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, глав с результатами собственного исследования, обсуждения, выводов, списка литературы и списка сокращений. Работа содержит 36 рисунков и 3 таблицы. Список литературы включает 516 источников.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 25 научных работ, из них 25 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в Scopus, Web of Science и РИНЦ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В первой главе диссертации проведён систематический анализ современного состояния проблемы ВЗК с акцентом на молекулярные, метаболические и микробиомные механизмы регуляции эпителиальной проницаемости и системных нарушений. Обзор состоит из пяти основных разделов. В первом разделе подробно охарактеризованы эпидемиология, клинико-морфологические особенности и дифференциальная диагностика язвенного колита и болезни Крона, включая внекишечные проявления. Особое внимание уделено структурно-функциональной организации кишечного барьера. Второй раздел посвящён ассоциированным с микробиотой механизмам развития ВЗК. Представлен современный взгляд на состав симбиотической микробиоты, ее метаболическую активность и иммуномодулирующую роль. Детально описан дисбиоз при ВЗК: снижение бутират-продуцирующих Firmicutes, увеличение

Proteobacteria, нарушение метаболизма триптофана и короткоцепочечных жирных кислот. Важным компонентом раздела является анализ оси «микробиота–кишечник–мозг»: показана двунаправленная связь между ВЗК и тревожно-депрессивными расстройствами, обсуждаются механизмы системного воспаления, нарушения метаболизма триптофана и влияние микробных метаболитов на нейроиммунные взаимодействия. Третий раздел посвящён метаболическим аспектам воспаления кишечника. Рассмотрены нарушения энергетического метаболизма, метаболизм аминокислот и липидов. Обсуждается связь церамидов с перестройкой актинового цитоскелета и дестабилизацией межклеточных контактов. Четвёртый раздел представляет анализ экспериментальных моделей ВЗК: химически индуцированные, генетически модифицированные, модели с адоптивным переносом клеток иммунодефицитным животным, гнотобиотические системы и отдельно охарактеризованы клеточные модели. В заключении к обзору сформулированы нерешённые вопросы: необходимость выявления универсальных ультраструктурных перестроек эпителия при ВЗК, идентификация ключевых генов-регуляторов целостности барьера, связь между метаболическими нарушениями, микробиомом и риском колоректального рака, а также метаболические механизмы влияния кишечного воспаления на поведение через ось «микробиота–кишечник–мозг».

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование включало три модели ВЗК с различной этиологией на мышах: генетически обусловленное, химически индуцированное и вызванное адоптивным переносом наивных Т-лимфоцитов иммунодефицитным животным воспаление кишечника. Также в работе были использованы биоптаты трёх пациентов с язвенным колитом и двух людей без анамнеза ВЗК. Работы с пациентами и лабораторными животными одобрены этической комиссией, номера протоколов приведены в главе 2. Кроме того, в работе использована химически индуцированная модель колоректального рака на фоне хронического воспаления, а также диетическое введение фосфолипидов и ректальное применение ингибиторов актина и сфинголипидного обмена.

Из молекулярно-биологических подходов применялись транскриптомное секвенирование (анализ дифференциальной экспрессии и коэкспрессионных сетей), мультиплексный анализ цитокинов, иммуноблоттинг и иммунопреципитация белкового комплекса клаудина-3 из нативных белковых экстрактов толстой кишки с последующей масс-спектрометрией для идентификации белковых партнёров. Оценка митохондриальной функции включала измерение потребления кислорода в изолированных крипах (Seahorse XF), содержания АТФ

и активных форм кислорода. Морфологический анализ выполнен методами световой, конфокальной и трансмиссионной электронной микроскопии с морфометрией межклеточных контактов и митохондрий на ультраструктурном уровне.

Метаболомный анализ сыворотки и тканей проведён методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией. Оценка проницаемости эпителия *in vitro* проводилась с использованием кишечных органоидов мышей. Измерение кишечной проницаемости *in vivo* проводилось с помощью внутрижелудочного введения флуоресцентного декстрана с последующей оценкой его концентрации в сыворотке крови.

Поведенческое фенотипирование включало тесты на тревожность, депрессивно-подобное поведение, когнитивные функции, сенсомоторную фильтрацию (преимпульсное ингибирование стартл-рефлекса) и социальное поведение.

Статистическая обработка выполнена в среде R и STATISTICA с применением параметрических и непараметрических критериев, поправки на множественные сравнения и методов биоинформатики (LefSe, WGCNA, байесовские сети). Такой комплекс методик позволил всесторонне охарактеризовать молекулярные, ультраструктурные и системные нарушения при воспалении кишечника.

Ультраструктурный анализ выполняли в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск). Метаболомный анализ методом ядерного магнитного резонанса выполняли в лаборатории протеомики и метаболомики Международного томографического центра СО РАН (Новосибирск). Метаболомный анализ липидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с последующей масс-спектрометрией проводили в ЦКП Передовой масс-спектрометрии Сколтеха (Москва). Сортировку клеток проводили в ЦКП «Дизайн рекомбинантных антител» при ИМКБ СО РАН (Новосибирск).

ГЛАВА 3. НАРУШЕНИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА КАК КЛЮЧЕВАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИТЕЛИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ

В третьей главе была использована модель мышей с нокаутом гена, кодирующего муцин-2 (*Muc2*^{-/-}), которая воспроизводит хроническое воспаление кишечника, и биоптаты толстой и тонкой кишки пациентов с ВЗК для оценки ультраструктурных нарушений эпителиального барьера.

Показано, что у мышей линии *Muc2*^{-/-} развивается умеренное хроническое воспаление с повышением провоспалительных цитокинов (IFN- γ , IL-1 β , TNF и IL-17), противовоспалительного цитокина IL-10

и увеличением кишечной проницаемости для флуоресцентно меченого декстрана молекулярным весом 4 кДа. Трансмиссионная электронная микроскопия выявила выраженные дефекты апикального соединительного комплекса: расширение плотных и адгезивных контактов, увеличение доли контактов с дефектами структуры (Рис. 1).

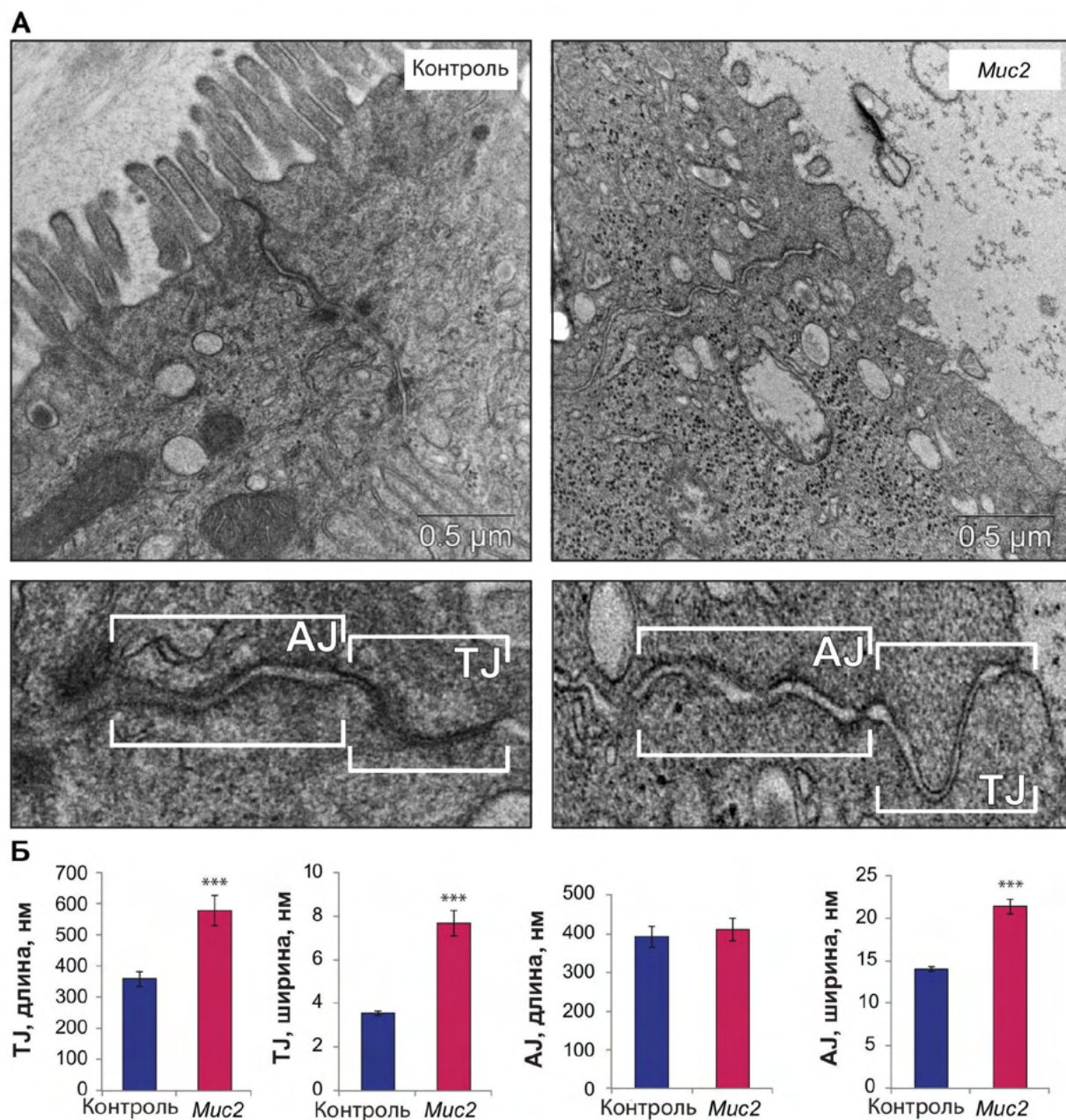


Рис. 1: Структурные дефекты межклеточных контактов как причина повышенной проницаемости кишечника у мышей *Muc2*^{-/-}. Повышенная проницаемость кишечника является результатом нарушения структурной целостности плотных контактов. **(А)** Трансмиссионная электронная микроскопия эпителия толстой кишки мышей C57BL/6 и *Muc2*^{-/-} с нарушенной морфологией плотных контактов (ПК, TJ) и адгезивных контактов (АК, AJ). **(Б)** Морфометрический анализ плотных контактов (TJ): Длина ($p < 0,001$, *U*-тест Манна–Уитни) и ширина ($p < 0,001$, *U*-тест Манна–Уитни). Морфометрический анализ адгезивных контактов (AJ): Длина и ширина ($p < 0,001$, *t*-критерий Стьюдента). *** – $p < 0,001$.

Также было отмечено значительное нарушение архитектуры микроворсинок — уменьшение их числа и длины, удлинение корневых участков, что указывает на ремоделирование актинового цитоскелета. Одновременно в эпителии толстой кишки модельных животных зарегистрирована митохондриальная дисфункция: снижение числа митохондрий, уменьшение количества крист, падение уровня АТФ и потеря дыхательного резерва. Сравнительный ультраструктурный анализ проведенный на пилотной выборке биоптатов толстой кишки пациентов с язвенным колитом выявил сходные изменения микроворсинок, что подтверждает клиническую применимость данных, полученных в экспериментальной модели.

Для поиска потенциальных генов-регуляторов перестройки цитоскелета при воспалении был применён системно-биологический подход, объединяющий анализ взвешенных сетей коэкспрессии генов (WGCNA) и байесовские сети на основе транскриптомных данных пациентов с болезнью Крона. Построенная регуляторная сеть выявила взаимосвязи между несколькими десятками генов и четыре главных узла — гены *PGRMC1*, *HEBP1*, *ANXA5* и *PREX1* (Рис. 2). Анализ онтологии генов показал обогащение процессов, связанных с организацией актинового цитоскелета. Сравнение с транскриптомным профилем кишечника мышей *Muc2*^{-/-} позволило идентифицировать ген *PREX1* как единственный ортолог, сонаправленно изменяющий экспрессию при воспалении у обоих видов. *PREX1* является активатором малой ГТФазы RAC1, регулирующей динамику актина, что делает его перспективной мишенью для контроля структуры микроворсинок и целостности барьера при хроническом колите.

Таким образом, в главе 3 показано, что хроническое воспаление кишечника сопровождается комплексными ультраструктурными нарушениями эпителия (межклеточные контакты, микроворсинки, митохондрии), а интегрированный мультиомиксный анализ позволяет выявить ключевые генетические регуляторы этих процессов, среди которых центральное место занимает *PREX1*.

ГЛАВА 4. РОЛЬ АКТИНА В ПОДДЕРЖАНИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА

В четвёртой главе на трёх моделях хронического колита *in vivo* изучена роль филаментного актина (F-актина) в поддержании целостности плотных и адгезивных контактов. В качестве экспериментальных моделей использованы мыши с генетически обусловленным, химически индуцированным и вызванным адоптивным переносом Т-клеток иммунодефицитным животным колитом. Оценка количества F-актина в эпителии также была проведена на пилотной выборке биоптатов толстой и тонкой кишки пациентов с язвенным колитом.

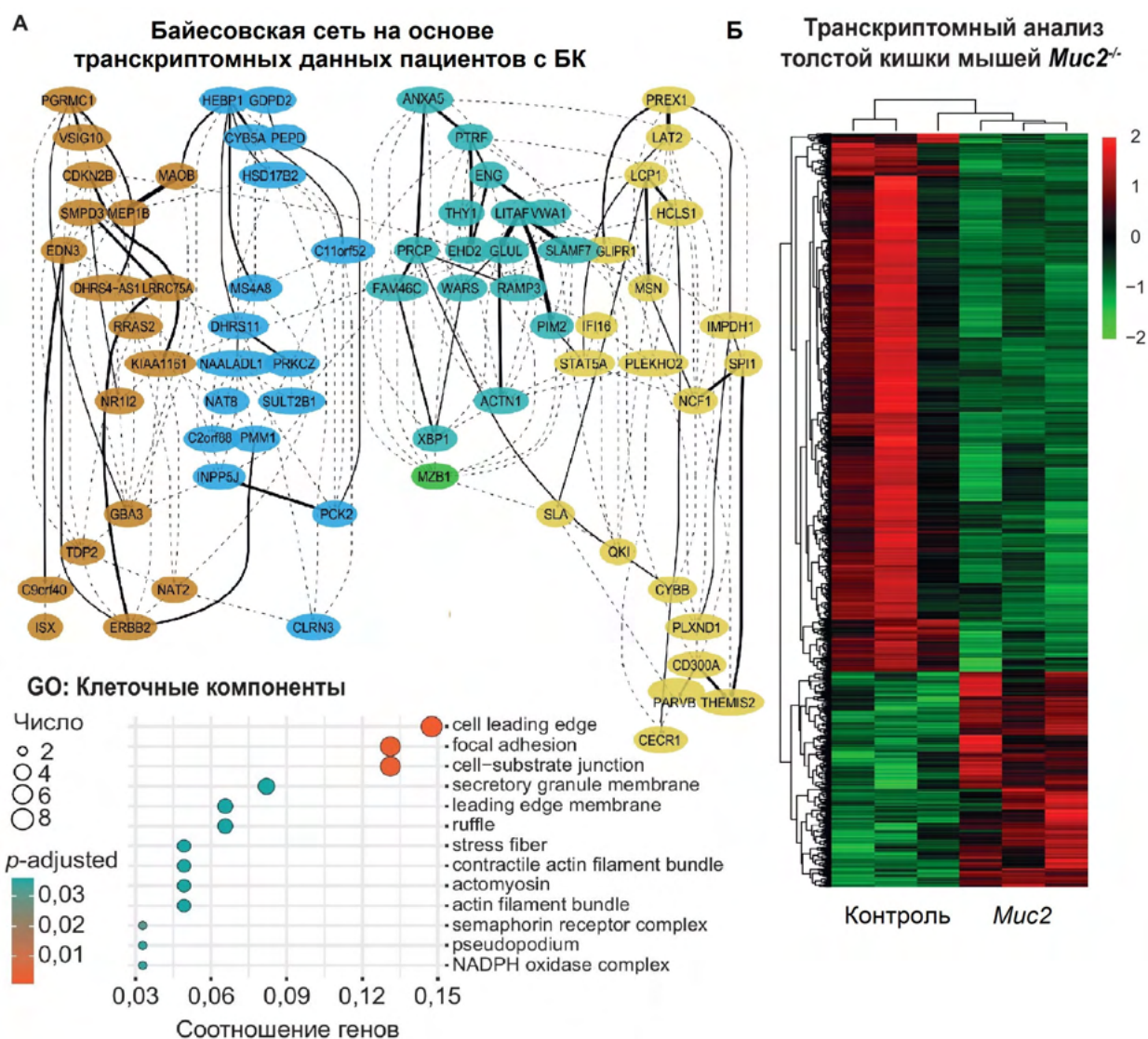


Рис. 2: Построение и валидация байесовской сети на основе транскриптомных данных в когорте пациентов с болезнью Крона и валидация выявленных генов на данных генной экспрессии, полученных для модельных животных. (А) Байесовская сеть на основе хаб-генов основных модулей, выявленных с помощью анализа WCGNA (гены, относящиеся к одному модулю, отмечены цветом). Сеть построена с использованием 81 гена и демонстрирует иерархическую модульную структуру. Более толстые линии обозначают более сильные связи, пунктирные линии — более слабые взаимодействия. Ниже представлен анализ онтологии генов (GO), идентифицированных в байесовской сети, по аннотации клеточных компонентов. **(Б)** Данные транскриптомного анализа образцов толстой кишки мышей линии *Muc2*^{-/-} и контрольной группы *Muc2*^{+/+}, использованные для поиска генов, которые однонаправленно меняют экспрессию при болезни Крона (БК) у людей и хроническом воспалении у модельных животных.

Показано, что при хроническом воспалении в модели *Muc2*^{-/-} происходит значительное снижение количества F-актина как в области апикальной, так и латеральной мембраны энтероцитов, что сопровождается делокализацией белков плотных контактов (клаудин-3 и клаудин-7) и адгезивных контактов (Е-кадгерин, β -катенин) с латеральной мембраны.

При этом суммарный уровень этих белков не изменяется, что указывает на посттрансляционный характер выявленных нарушений (Рис. 3 и Рис. 4).

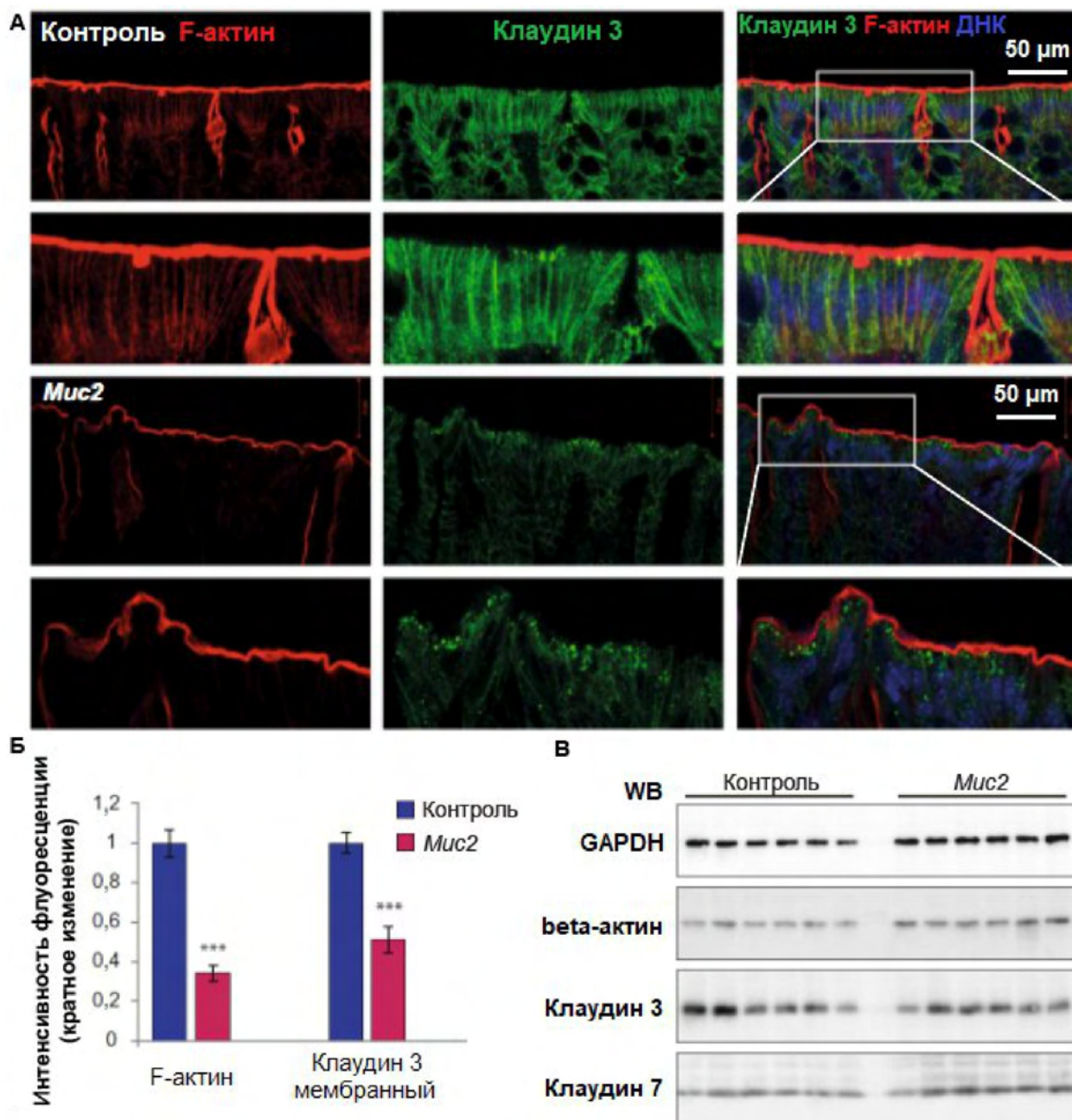


Рис. 3: Мембранная локализация белка клаудин-3 в модели хронического колита *Muc2*^{-/-}. (А) Двойное иммуноокрашивание клаудина-3 и F-актина в толстой кишке мышей C57BL/6 (Контрoль) и *Muc2*^{-/-} (Мuc2). (Б) Количественная оценка интенсивности флуоресценции белка клаудина-3 вдоль клеточной мембраны и F-актина в щеточной каемке ($p < 0,001$, по сравнению с C57BL/6, *t*-критерий Стьюдента, $n = 3$). (В) Вестерн-блоттинг суммарного белка в образцах толстой кишки. Количественная оценка данных вестерн-блоттинга (нормированная по уровню белка GAPDH, кратность изменения) не показала различий по уровню общего количества белков клаудин-3 и клаудин-7. *** – $p < 0,001$.

Снижение количества F-актина в области апикальных и латеральных мембран было отмечено и в модели хронического колита, индуцированного

натриевой солью сульфата декстрана (Рис. 5 А-Б), так же как и снижение количества клаудина-7 и β -катенина в области межклеточных соединений.

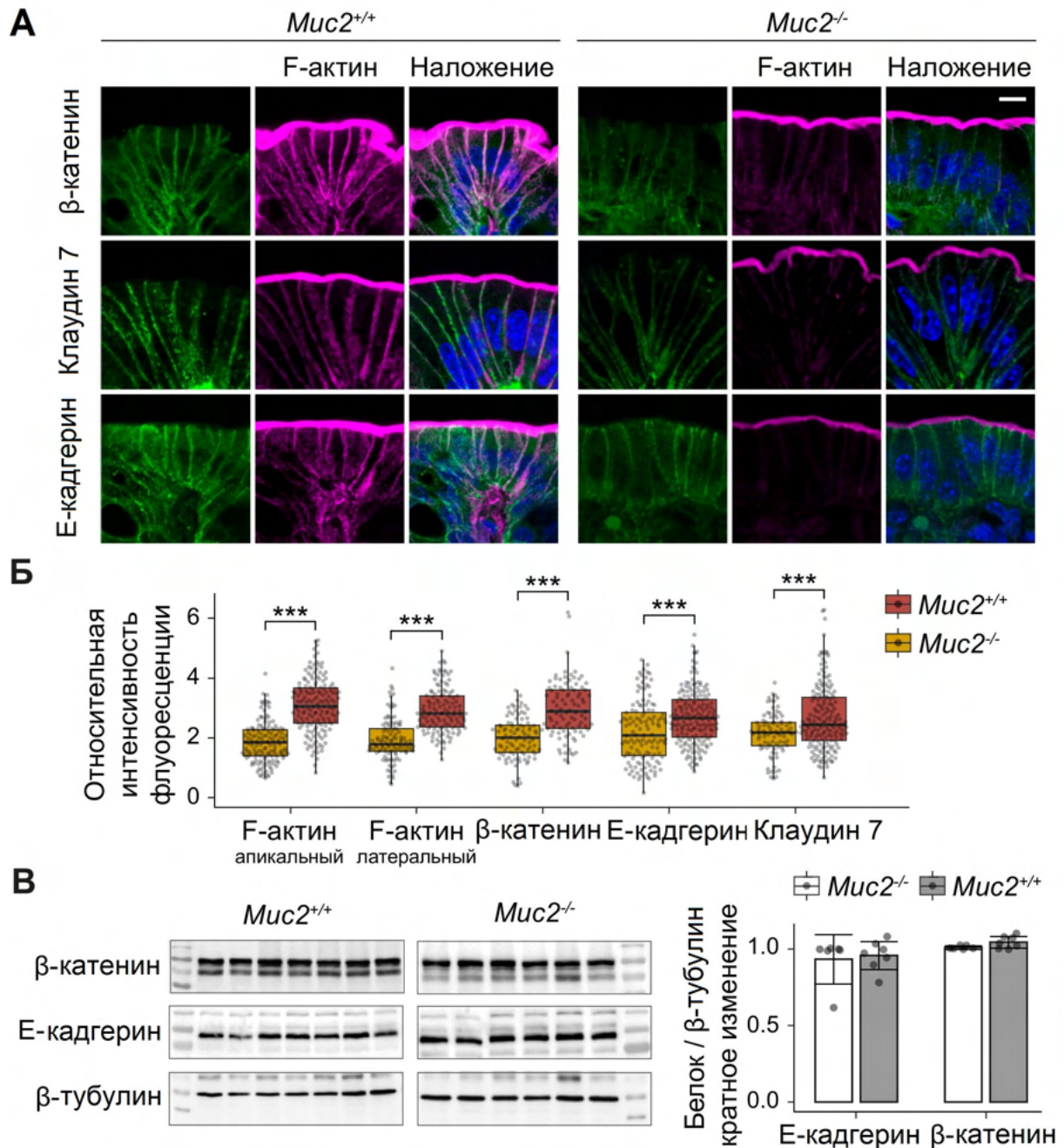


Рис. 4: Мембранная локализация белков адгезивных контактов (АК) и плотных контактов (ПК) нарушена в модели хронического колита *Muc2^{-/-}*. **(А)** Иммуноокрашивание белков АК и ПК в толстой кишке мышей *Muc2^{-/-}*. Масштаб — 10 мкм. **(Б)** Количественная оценка интенсивности флуоресценции белков АК и ПК вдоль клеточной мембраны (* - $p < 0,05$, *** - $p < 0,001$, $n = 3$, U -тест Манна-Уитни с поправкой Бенджамини-Хохберга). **(В)** Вестерн-блоттинг суммарного белка в образцах толстой кишки. β -тубулин (55 кДа) использовался в качестве контроля загрузки. Данные показаны как среднее $\pm 95\%$ с доверительным интервалом.

В модели адоптивного переноса клеток $CD4+CD45RB^{\text{high}}$ животным с иммунодефицитом также происходило снижение количества F-актина и

клаудина-7, а количество β -катенина в области межклеточных соединений не менялось (Рис. 5). Сходные изменения архитектуры F-актина — снижение в области апикальной и латеральной мембраны — обнаружены в биоптатах толстой кишки пациентов с язвенным колитом, что указывает на потенциальную клиническую значимость полученных результатов.

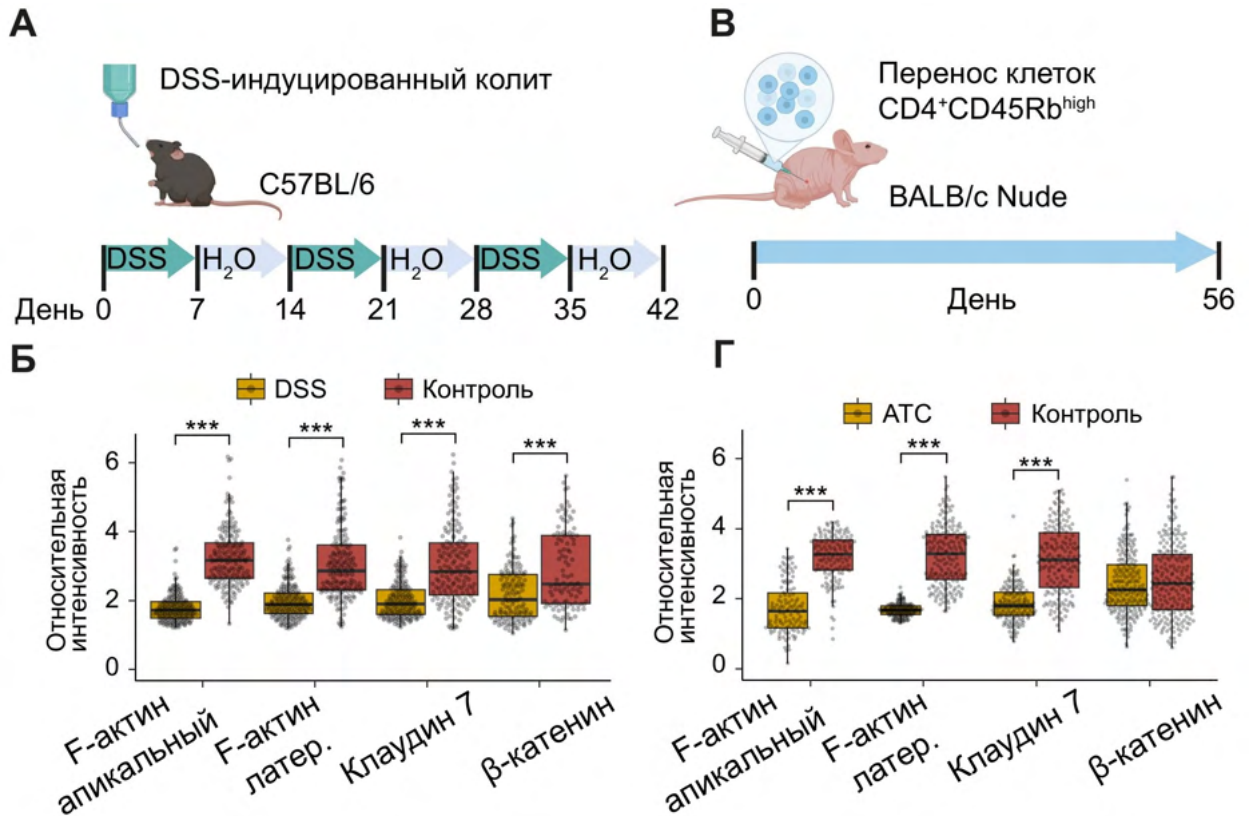


Рис. 5: Динамика актина нарушена в различных моделях хронического колита. (А) Схема получения хронического химически индуцированного колита (DSS - натриевая соль сульфата декстрана). (Б) Количественная оценка интенсивности флуоресценции белков F-актина, β -катенина и клаудина-7 на клеточной мембране эпителиоцитов в толстой кишке мышей с DSS-индуцированным хроническим колитом (DSS *vs* контроль, $p < 0,001$ для всех белков, $n = 3$, U-тест Манна–Уитни). (В) Схема получения модели хронического колита с помощью адоптивного переноса клеток CD4⁺CD45Rb^{high} (ATC). (Г) Количественная оценка интенсивности флуоресценции белков F-актина, β -катенина и клаудина-7 на клеточной мембране в толстой кишке мышей группы ATC (ATC *vs* контроль, $p < 0,001$ для всех белков, $n = 3$, U-тест Манна–Уитни).

Фармакологическая модуляция динамики полимеризации актина с использованием ингибиторов латрункулина А, джасплакинолида и Y-27632 показала, что нарушение баланса между мономерным и полимерным актином вызывает делокализацию клаудина-7 и β -катенина с латеральной мембраны и повышение проницаемости эпителия в органоидах кишечника.

Методом коиммунопреципитации с последующей масс-спектрометрией выявлено, что в эпителии мышей *Muc2*^{-/-} значительно ослабевает взаимодействие клаудина-3 с актин-связывающими белками (комплекс

Arp2/3, α -актинин, эзрин, винкулин), тогда как в норме эти белки образуют стабильный комплекс (Рис. 6).

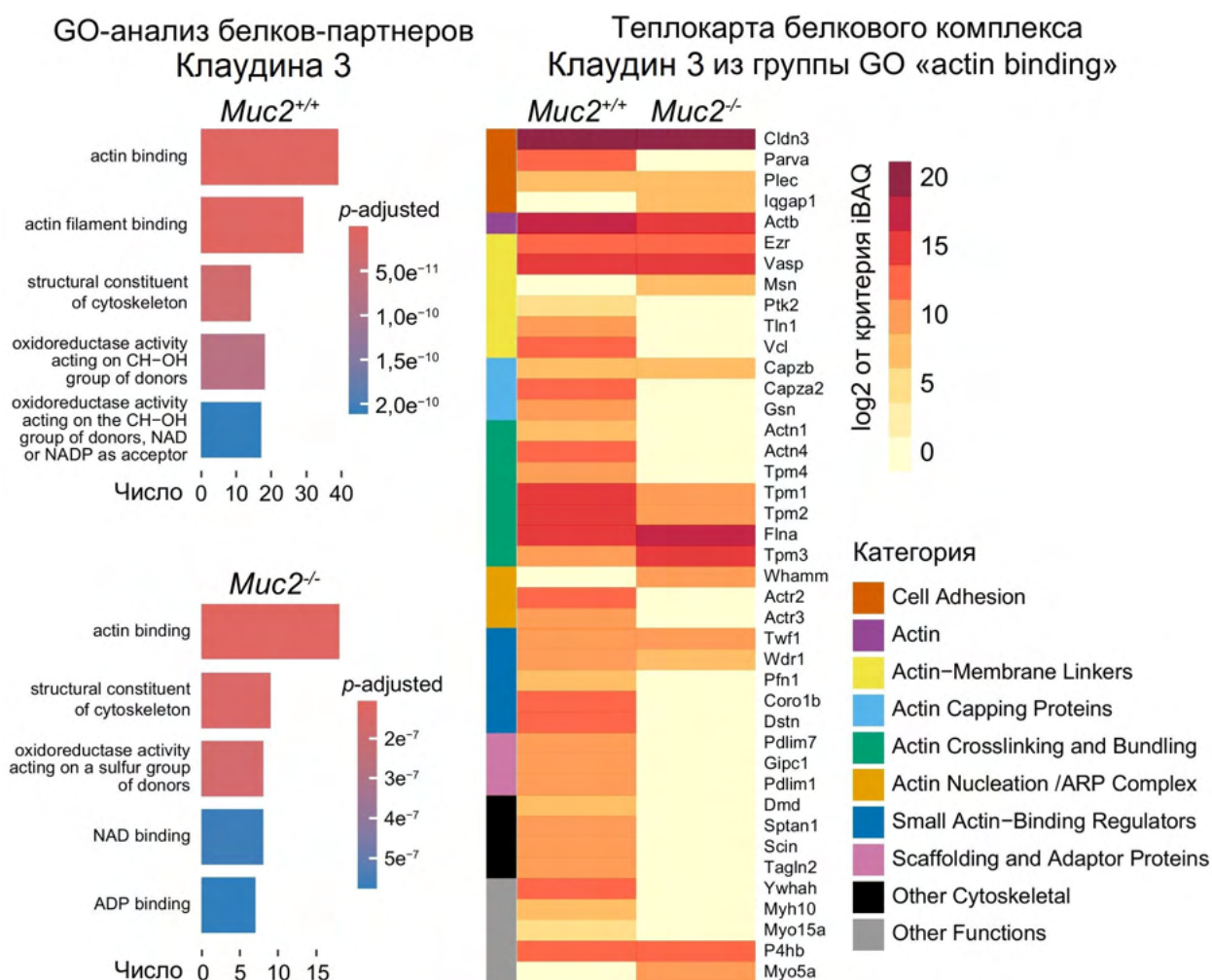


Рис. 6: Сравнительный анализ интерактома белка клаудина-3 в белковых экстрактах ткани кишки, полученных от животных линий *Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}*. (А) Обогащение онтологии генов (GO) для интерактома белка клаудина-3 в образцах, полученных от мышей двух групп. (Б) Тепловая карта значений критерия обогащения log₂ iBAQ для белков, аннотированных в группе онтологии генов «связывание с актином», обнаруженных в иммунопреципитатах клаудина 3 из ткани толстой кишки мышей линий *Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}*.

Таким образом, в главе 4 установлено, что нарушение организации F-актина является общим свойством эпителия при хроническом воспалении кишечника, независимо от этиологии, и ведёт к разобщению актинового цитоскелета с белками межклеточных контактов.

ГЛАВА 5. РОЛЬ МЕТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ В ФОРМИРОВАНИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА

В пятой главе на модели мышей *Muc2^{-/-}* изучена роль метаболических нарушений, в первую очередь липидного профиля, в формировании дисфункции кишечного барьера.

Метаболомный анализ изолированных крипт толстой кишки выявил значительный сдвиг липидного профиля при хроническом колите: накопление церамидов, гликофинголипидов, фосфатидилхолинов, фосфатидилсеринов и других фосфолипидов. Одновременно отмечено изменение экспрессии генов, кодирующих фосфолипазы (*Pla2g2e*, *Plcb1*, *Plcb4*) и церамидсинтазы (*CerS3*, *CerS6*), что согласуется с данными метаболомного анализа (Рис. 7).

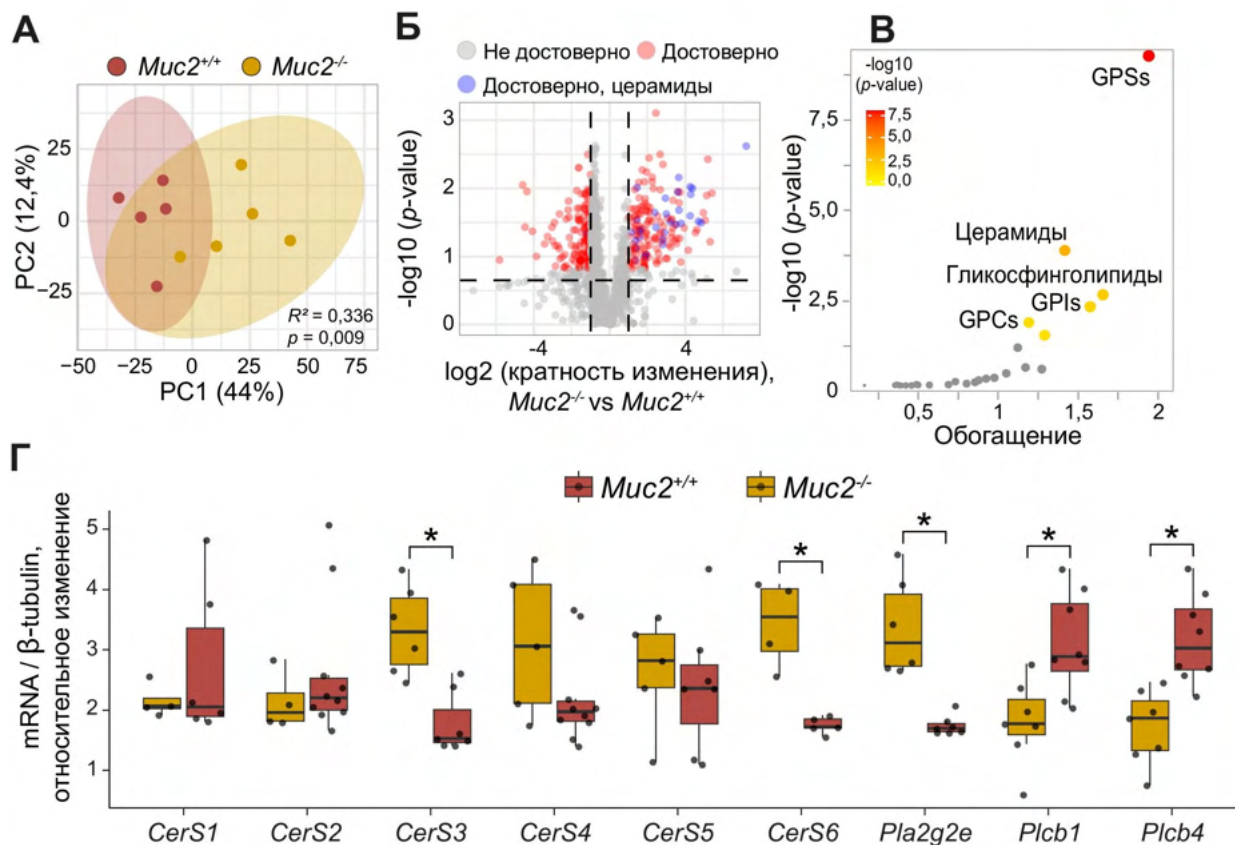


Рис. 7: Метаболический сдвиг и изменение уровня липидов в криптах толстой кишки мышей линии *Muc2*^{-/-}. (А) Анализ метаболомных профилей методом главных компонент (РСА) показал значительные различия между животными генотипа *Muc2*^{-/-} и однопометниками дикого типа. (Б) Вулкан-плот показывает дифференциально представленные метаболиты (отмечены синим и красным). (В) Оценка обогащения путей метаболизма фосфолипидов и сфинголипидов. Анализ накопления церамидов и гликофинголипидов с помощью инструментов MetaboAnalyst 5.0. (Г) Изменение экспрессии генов, кодирующих фосфолипазы (*Pla2g2e*, *Plcb1*, *Plcb4*) и церамидсинтазы (*CerS3*, *CerS6*). * – $p < 0,05$ по сравнению с *Muc2*^{+/+}.

Для проверки роли фосфолипидов животным добавляли в корм избыток фосфатидилхолина, фосфатидилсерина и фосфатидной кислоты в течение двух недель. Это вызывало повреждение митохондрий и незначительное расширение межклеточных контактов, однако не приводило к повышению кишечной проницаемости *in vivo*. Таким образом, избыток этих фосфолипидов не является достаточным условием для развития

барьерной дисфункции (Рис. 8).

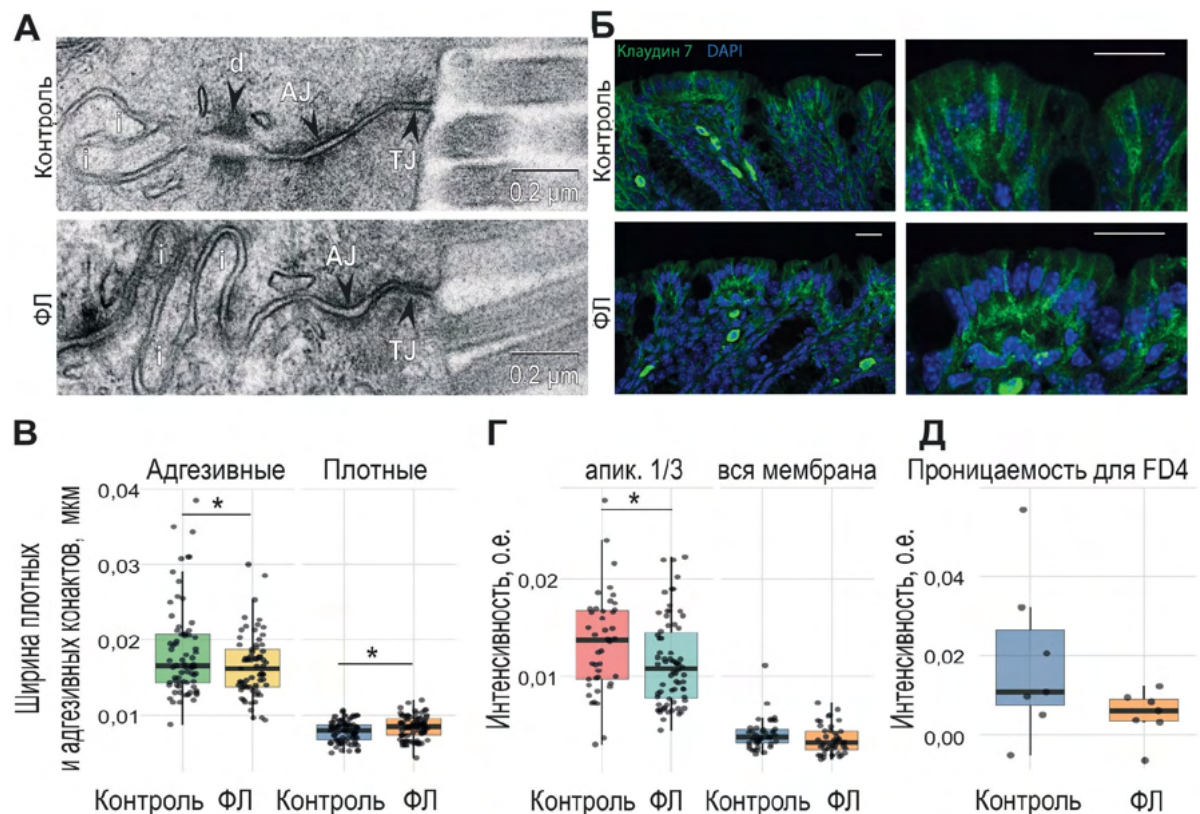


Рис. 8: Ультроструктурный анализ морфологии плотных и адгезивных контактов, иммуногистохимический анализ локализации клаудина-7 и кишечная проницаемость при добавлении фосфолипидов в диету мышей в течение двух недель. (А) Электронно-микроскопические изображения апикальных контактов между клетками. AJ – адгезивный контакт; d – десмосома; i – интердигитации; TJ – плотный контакт. (Б) Иммуноокрашивание клаудина-7 в толстой кишке контрольных мышей и мышей, получавших фосфолипиды (ФЛ) в течение двух недель. Масштаб – 15 мкм. (В) Морфометрический анализ ширины плотных (TJ) и адгезивных (AJ) контактов. (Г) Количественная оценка интенсивности флуоресценции клаудина-7 на латеральной клеточной мембране и в ее апикальной трети. (Д) Оценка кишечной проницаемости с помощью FITC-декстран 4 кДа ($n = 7$ для обеих групп, * $p < 0,05$, t -критерий Стьюдента).

Напротив, ингибирование синтеза церамидов фумонизином В1 частично восстанавливало организацию F-актина, способствовало восстановлению уровня β -катенина и клаудина-7 на латеральной мембране и снижало проницаемость кишечника в двух моделях воспаления (Рис. 9).

Таким образом, в главе 5 установлено, что среди выявленных метаболических изменений именно церамиды, а не фосфолипиды, вовлечены в нарушение эпителиального барьера при ВЗК, затрагивая ремоделирование F-актина и делокализацию белков плотных и адгезивных контактов.

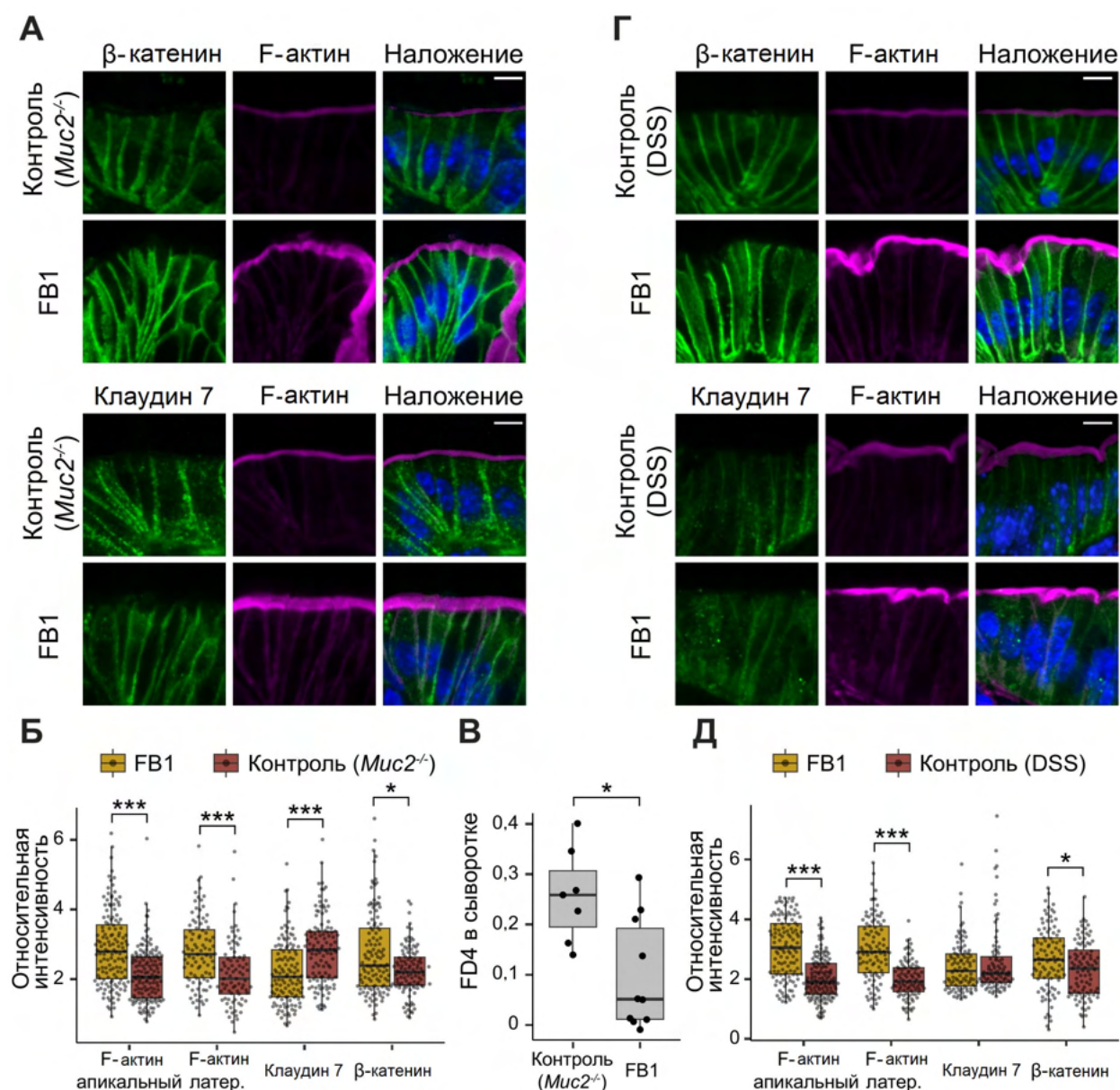


Рис. 9: Ингибирование биосинтеза церамида частично восстанавливает проницаемость кишечного барьера в мышиных моделях хронического колита. (А) Иммуноокрашивание клаудина-7 и β -катенина в толстой кишке мышей линии *Muc2^{-/-}* после ректального введения фумонизина B1 (FB1) в течение 12 часов. Масштаб — 10 мкм. (Б) Количественная оценка интенсивности флуоресценции F-актина, клаудина-7 и β -катенина на клеточной мембране эпителиоцитов толстой кишки мышей *Muc2^{-/-}* после введения FB1 (*U*-тест Манна–Уитни, $p < 0,001$, $n = 3$). (В) Анализ проницаемости *in vivo* у мышей линии *Muc2^{-/-}* после обработки FB1 (*U*-тест Манна–Уитни, $p < 0,05$, $n = 7 - 10$). (Г) Иммуноокрашивание клаудина-7 и β -катенина в толстой кишке мышей с DSS-индуцированным колитом после ректального введения FB1 в течение 12 часов. Масштаб — 10 мкм. (Д) Количественная оценка интенсивности флуоресценции F-актина, клаудина-7 и β -катенина на клеточной мембране эпителиоцитов толстой кишки мышей с DSS-индуцированным колитом после введения FB1 (*U*-тест Манна–Уитни, $p < 0,001$, $n = 3$). * — $p < 0,05$, *** — $p < 0,001$.

ГЛАВА 6. МИКРОБИОТА И МЕТАБОЛИЗМ АМИНОКИСЛОТ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ «КИШЕЧНИК–МОЗГ»

В шестой главе на модели генетически обусловленного и химически индуцированного воспаления кишечника изучено влияние кишечной микробиоты и её метаболитов на поведенческие нарушения. На модели *Muc2*^{-/-} показано изменение системного и центрального метаболизма на фоне хронического воспаления кишечника (Рис. 10).

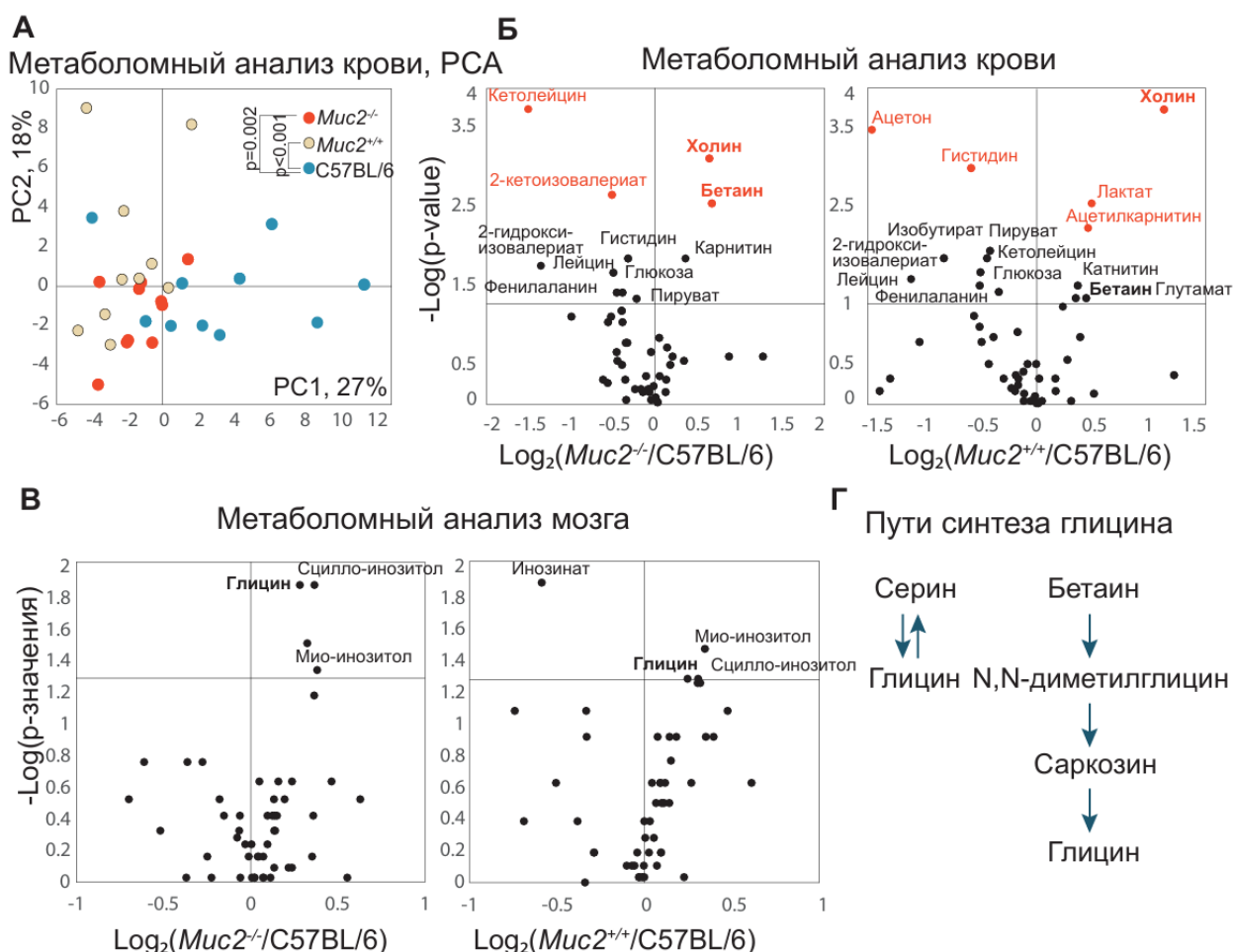


Рис. 10: Метаболомное профилирование крови и мозга мышей групп *Muc2*^{-/-} и *Muc2*^{+/+} в сравнении с группой C57BL/6. (А) Анализ главных компонент (РСА) метаболомных профилей крови по результатам ЯМР-спектроскопии ($n = 10$ на группу). **(Б)** Вулкан-плоты метаболитов крови по данным ЯМР-спектроскопии. Горизонтальная линия соответствует уровню значимости $p = 0,05$. Вертикальная линия соответствует отношению, равному 1. Метаболиты с различиями при $p < 0,01$ показаны красным цветом. **(В)** Вулкан-плоты метаболитов мозга по данным ЯМР-спектроскопии ($n = 5-6$). На плотах приведены нескорректированные значения p -критерия. После применения поправки Бенжамина-Хохберга все изменения, отмеченные как достоверные, сохраняются, кроме различий по мио-инозитолу (нет различий) и по глицину в группах C57BL/6 и *Muc2*^{+/+}, где $p = 0,067$. **(Г)** Схемы биосинтеза глицина из серина и бетаина. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, vs C57BL/6. ## – $p < 0,01$, vs *Muc2*^{+/+}.

А  Открытое поле

Б  Темно-светлая камера

В  Стартл-рефлекс

Г  Тест с двумя интродуцерами

Д  Социальное взаимодействие

Е  Открытое поле

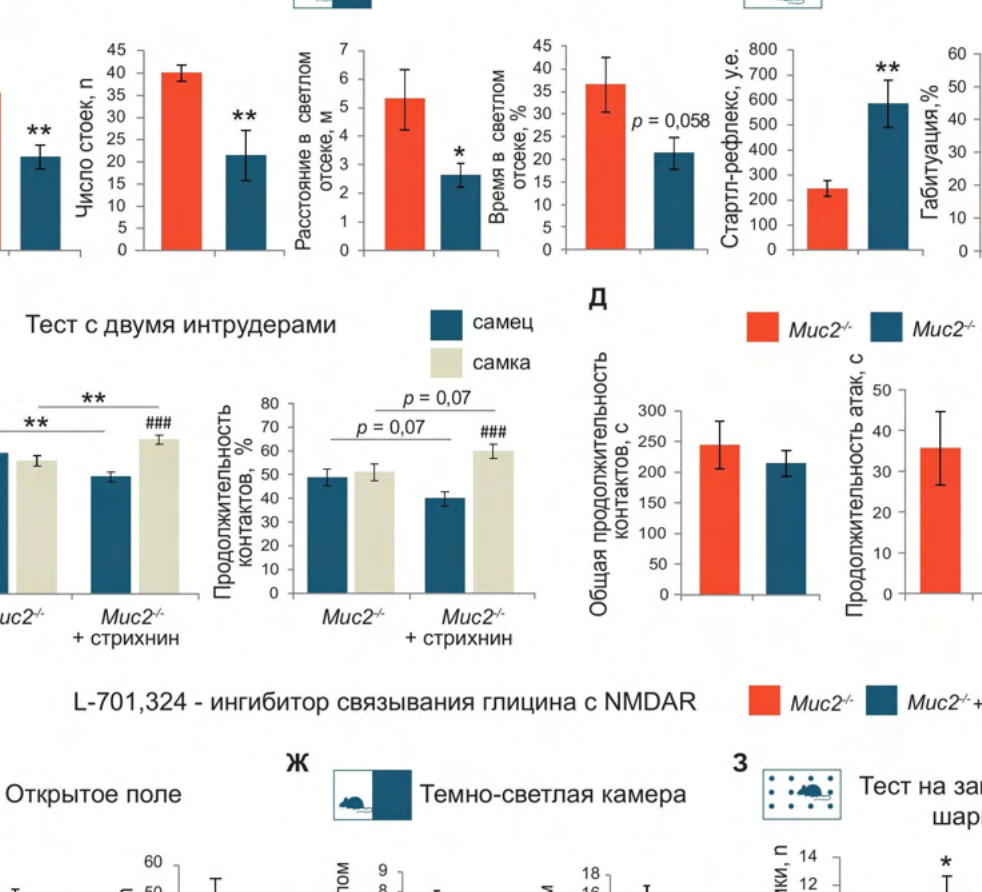
Ж  Темно-светлая камера

З  Тест на закапывание шариков

Легенда: ■ *Muc2^{-/-}* ■ *Muc2^{-/-} + стрихнин*

Легенда: ■ самец ■ самка

Легенда: ■ *Muc2^{-/-}* ■ *Muc2^{-/-} + L-701,324*



Panel	Test	Parameter	<i>Muc2^{-/-}</i>	<i>Muc2^{-/-} + Strychnine</i>	<i>Muc2^{-/-} + L-701,324</i>
А	Открытое поле	Путь, м	~23	~14**	~20**
		Число стоек, n	~40	~22**	~25*
Б	Темно-светлая камера	Расстояние в светлом отсеке, м	~5.2	~2.8*	~4.8
		Время в светлом отсеке, %	~37	~22	~10*
В	Стартл-рефлекс	Стартл-рефлекс, у.е.	~240	~580**	~6
		Габитуация, %	~15	~52**	~11*
Г	Тест с двумя интродуцерами	Число контактов, %	~52	~43	~58***
		Продолжительность контактов, %	~49	~40	~58***
Д	Социальное взаимодействие	Общая продолжительность контактов, с	~245	~215	~8*
		Продолжительность атак, с	~36	~8*	~11*
Е	Открытое поле	Путь, м	~37	~20**	~20**
		Число стоек, n	~46	~26*	~25*
Ж	Темно-светлая камера	Расстояние в светлом отсеке, м	~7.2	~4.8*	~4.8
		Время в светлом отсеке, %	~14	~9.5*	~9.5*
З	Тест на закапывание шариков	Закопанные шарики, n	~6	~11*	~11*

20

Было выявлено, что эти изменения не связаны напрямую с воспалением, поскольку передача микробиоты от мутантов однопометникам без мутации (*Muc2^{+/+}*) с помощью метода совместного содержания приводила к формированию сходного поведенческого фенотипа в отсутствие колита.

Метаболомное профилирование крови и мозга показало повышение уровня глицина в мозге и у мышей *Muc2^{-/-}* и у их однопометников *Muc2^{+/+}*, что было ассоциировано со сходными изменениями микробиоты у этих групп животных по сравнению с C57BL/6, которых содержали отдельно. Следует отметить, что животные всех экспериментальных групп были предварительно переведены на общий генетический фон C57BL/6. Совместное содержание животных *Muc2^{+/+}* и мышей C57BL/6 нивелировало различия в поведении. Предполагается, что увеличение глицина в мозге животных *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}* связано с изменением системного метаболизма холина и бетаина (Рис. 10).

Для того чтобы показать связь наблюдаемых поведенческих нарушений с глицинергической системой было проведено фармакологическое ингибирование глициновых рецепторов с помощью низких доз стрихнина и глицин-связывающего сайта рецепторов глутамата с помощью ингибитора L-701,324. Ингибирование глицинергической нейротрансмиссии частично нормализовало двигательную активность, тревожноподобное поведение, сенсомоторную фильтрацию и социальное предпочтение, указывая на возможную роль глицина как медиатора взаимодействия «микробиота–кишечник–мозг» в модели генетически обусловленного хронического воспаления кишечника и ассоциированной с ним микробиоты (Рис. 11).

Для оценки вклада микробиоты кишечника и ассоциированного с ней метаболизма аминокислот также была использована модель DSS-индуцированного хронического колита. В качестве модификатора состава микробиоты кишечника был использован моносахарид фукоза, который является терминальным моносахаридом основного секретируемого кишечного муцина (муцина-2) и служит источником энергии и фактором вирулентности для ряда кишечных бактерий. Гистологическое и клиническое исследования показали, что добавление фукозы при индукции хронического колита не влияет на развитие воспаления (Рис. 12).

В этой модели воспаления также наблюдалось изменение социального поведения: самцы с хроническим колитом не предпочитали запах самки в тесте на предпочтение запахов. Одновременно с этим у таких животных происходило снижение уровня триптофана в крови. В то же время добавление фукозы восстанавливало уровень триптофана, частично нормализовало состав микробиоты кишечника, в частности, снижение триптофан-продуцирующих бактерий *E. coli*, и восстанавливало предпочтение запаха самки (Рис. 13).

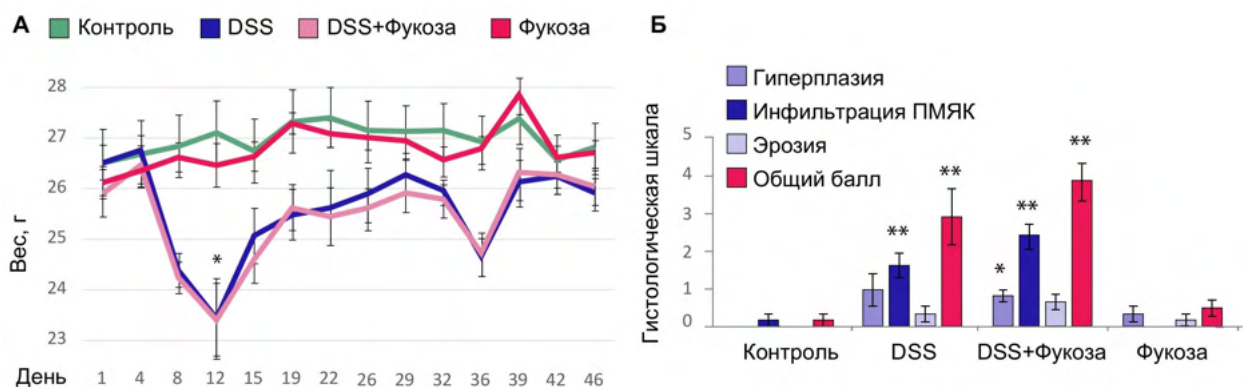


Рис. 12: Добавление фукозы не влияет на гистологические и клинические признаки воспаления. (А) Динамика массы тела ($n = 9 - 10$). (Б) Количественный анализ воспаления ($n = 6$). * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ в сравнении с контрольной группой. Показаны статистические значения до применения поправки на множественные сравнения. После ее применения все указанные различия остались значимыми.

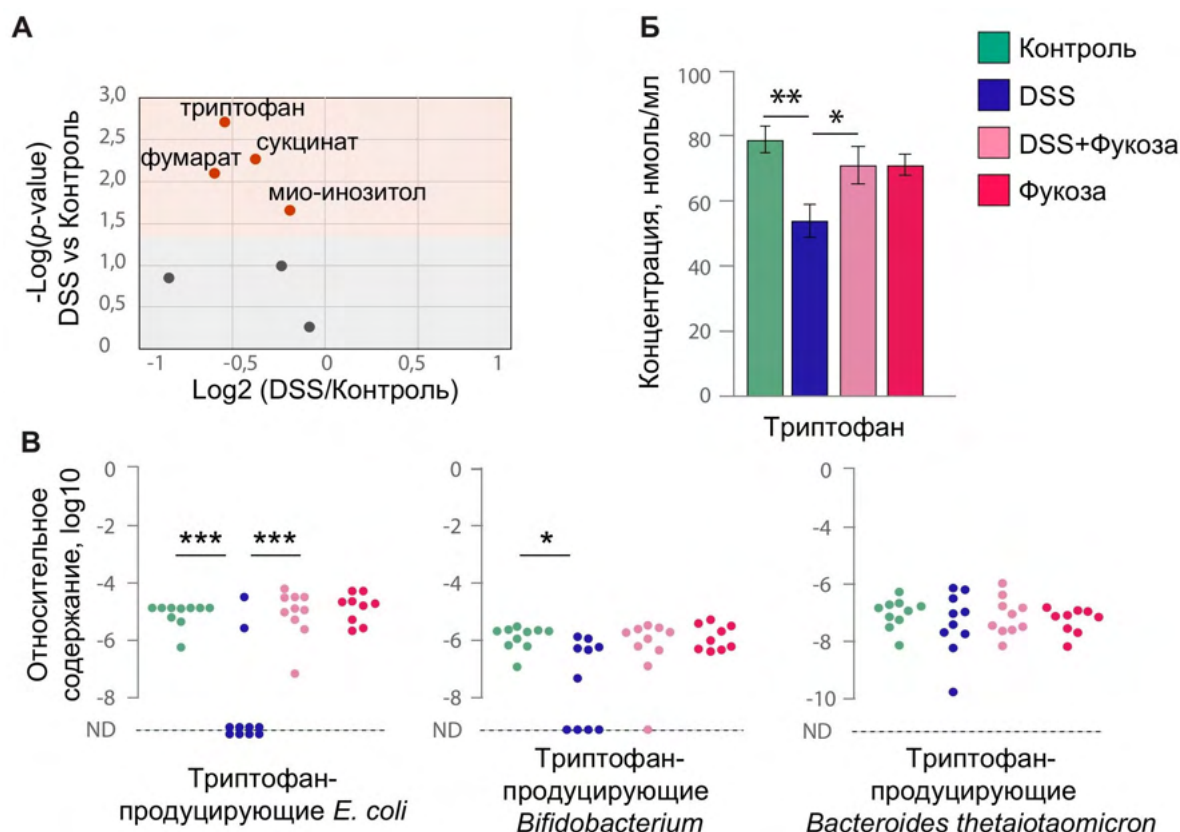


Рис. 13: Фукоза нормализует уровень триптофана в крови и число бактерий, способных к продукции триптофана, в кишечнике мышей. (А) Концентрации метаболитов в сыворотке крови, «Контроль» vs «DSS». (Б) Концентрация триптофана в сыворотке крови, измеренная с помощью ЯМР. Хронический колит приводил к потере около 30% триптофана в сыворотке крови. (В) Представленность кишечных бактерий, измеренная в фекалиях с помощью ПЦР в реальном времени, нормированная на универсальный участок гена *16S* рРНК. На вулкан-плотах показаны значения p -критерия без поправок, после применения поправки все значимые изменения сохранились. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Введение предшественника серотонина 5-гидрокситриптофана также восстанавливало поведенческий фенотип при химически индуцированном колите, что указывает на вовлечение метаболизма триптофана в формирование поведения в этой модели воспаления. Одновременно с этим предоставление интактным животным антибиотика рифампицина вызывало сходные поведенческие изменения в тесте на предпочтение запаха самки, что подтверждает участие микробиоты в регуляции этого вида поведения.

Таким образом, в главе 6 установлено, что хроническое воспаление кишечника модулирует поведение через изменение микробиоты и метаболизма аминокислот, а поведенческий фенотип и характер метаболических изменений зависят от этиологии воспаления.

ГЛАВА 7. ПРОПИОНАТ-ПРОДУЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ В НОРМЕ, ПРИ ВОСПАЛЕНИИ И КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ.

В седьмой главе на мышинной модели ассоциированного с воспалением колоректального рака (AOM/DSS) изучена роль исходного состава кишечной микробиоты в восприимчивости к колоректальному раку.

Показано, что мыши одной линии C57BL/6 с идентичным генетическим фоном, полученные из разных вивариев или содержащиеся в разных комнатах одного вивария, демонстрируют значительные различия в частоте и количестве опухолей после индукции модели AOM/DSS. Эти различия ассоциированы с исходным составом микробиоты: животные с более высоким содержанием *Akkermansia muciniphila* и *Bacteroides acidifaciens* до инъекции канцерогена азоксиметана (AOM) развивали больше опухолей. При этом, в ходе формирования опухолей относительная доля этих бактерий изменялась, что указывает на динамический характер микробиомных изменений в ходе канцерогенеза (Рис. 14).

Секвенирование гена *16S* рРНК и анализ LEfSe выявили специфические таксономические маркеры, ассоциированные с высокой восприимчивостью к опухолеобразованию, среди которых ключевыми оказались пропионат-продуцирующие бактерии *A. muciniphila* и *B. acidifaciens*. Корреляционный анализ показал, что исходное количество этих бактерий положительно коррелирует с числом опухолей в конце эксперимента (Рис. 15).

Таким образом, в главе 7 установлено, что исходный состав кишечной микробиоты может являться предиктором восприимчивости к колоректальному раку в модели AOM/DSS. Полученные данные поддерживают теорию «бактериальных драйверов-пассажира» в развитии колоректального рака (КРР) и подчеркивают необходимость оценки исходного микробиома при выявлении риска развития КРР.

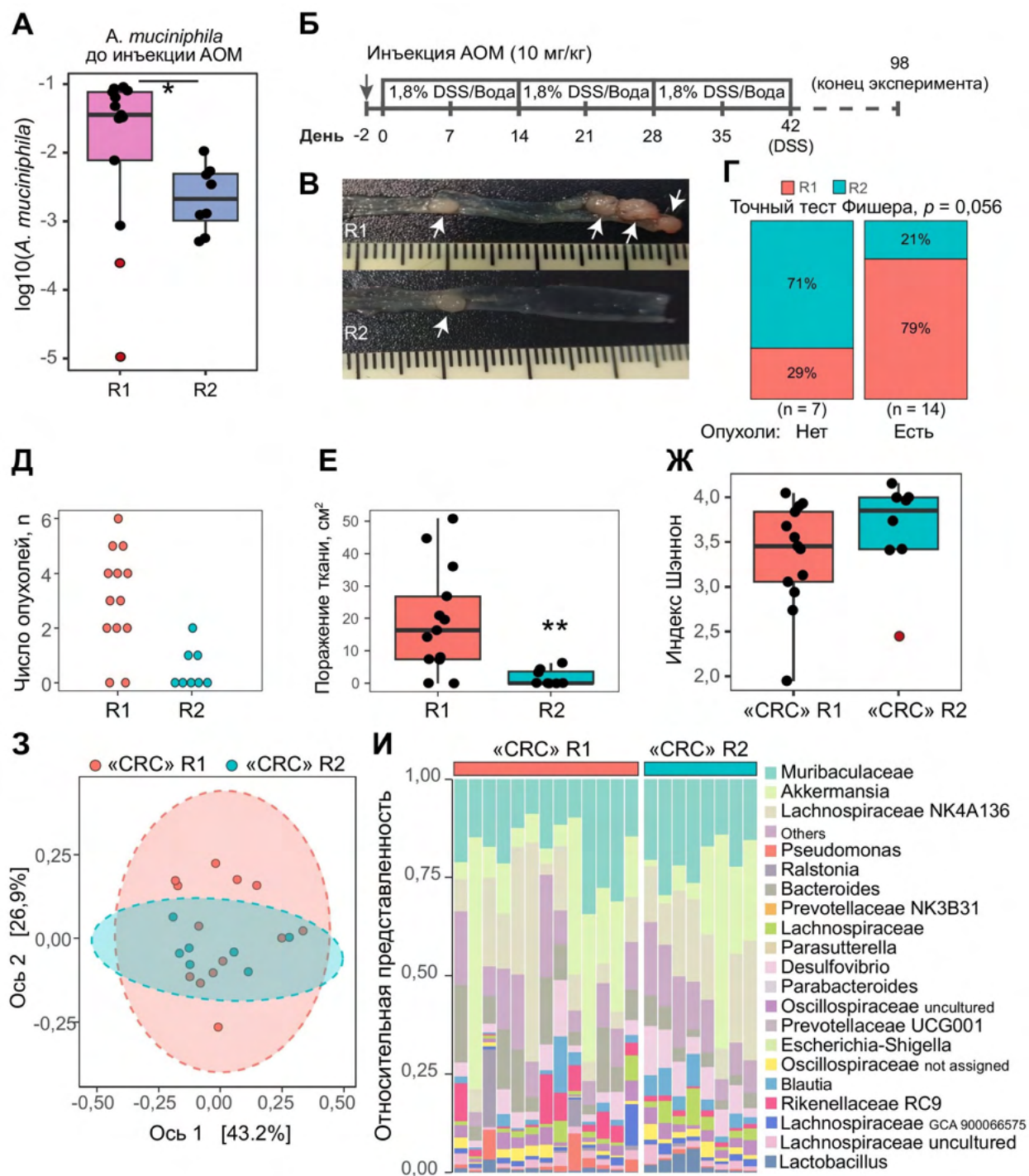


Рис. 14: Две когорты мышей с различным составом кишечной микробиоты показали различия в восприимчивости к колоректальному раку. (А) Уровень представленности ДНК гена *16S* рРНК *A. muciniphila* в фекалиях мышей из двух экспериментальных групп до индукции КРР. (Б) Схема эксперимента. (В) Опухоли в толстой кишке мышей на 98-й день эксперимента. R1 и R2 обозначают животных из разных групп. (Г) Процент мышей с опухолями в толстой кишке для каждой группы. (Д) Количество опухолей в толстой кишке мышей для каждой группы. (Е) Площадь ткани толстой кишки (мм²), пораженная опухолями. (Ж) Альфа-разнообразие на 98-й день эксперимента, $n = 8-13$. (З) Первые две оси анализа главных координат (РСоА) взвешенных расстояний UniFrac в конце эксперимента ($n = 8-13$). (И) Относительный уровень 15 основных родов бактерий в составе микробиома мышей в конце эксперимента ($n = 8-13$). «CRC» - точка сбора образцов КРР. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, критерий Вилкоксона. $n(R2) = 8$, $n(R1) = 13$.

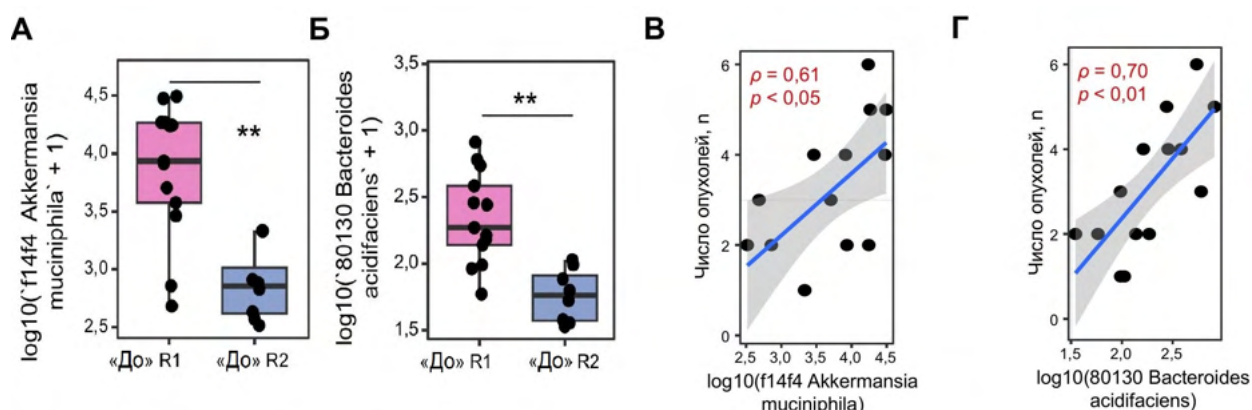


Рис. 15: Корреляция между выявленными «маркерными» бактериями в микробиоте двух колоний мышей до инъекции АОМ (точка «До»). (А–Б) Представленность выбранных маркерных бактерий в точках «До» ($n = 8 - 13$). (В–Г) Корреляция Спирмена между бактериальными маркерами КРР в точке «До» и количеством опухолей у мышей. «До» - точка до начала эксперимента (до инъекции АОМ). «R1» и «R2» - различные источники содержания животных. Для корреляционного анализа использован критерий Спирмена. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, критерий Вилкоксона. $n(R2) = 8$, $n(R1) = 13$.

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ

В обсуждении последовательно рассмотрены механизмы, связывающие метаболические нарушения с повреждением эпителиального барьера при ВЗК и системными осложнениями. Классическая парадигма, объясняющая нарушение барьера иммунной активацией (Chang *et al.*, 2017), дополняется оценкой роли метаболических нарушений при хроническом воспалении.

Обсуждение включает оценку ультраструктурных изменений эпителия кишечника на модели *Muc2^{-/-}* и оценивает возможную связь нарушения митохондриального дыхания и накопления фосфо- и сфинголипидов с изменением барьерных свойств эпителия (Novak и Mollen, 2015; Bock *et al.*, 2007; Suh и Saba, 2015).

Актиновый цитоскелет обсуждается как возможное механистическое звено между изменением эпителиального метаболизма и нарушением структуры и функции плотных и адгезивных контактов, что приводит к повышению проницаемости эпителиального барьера (Borisova *et al.*, 2020, Boyapati *et al.*, 2018). Предполагается, что дефицит АТФ может смещать равновесие в сторону деполимеризации актина, запуская эндоцитоз белков межклеточных контактов (Pollard *et al.*, 2003). Также в качестве возможного механизма нарушения эпителиального барьера обсуждается накопление церамидов. Церамиды способны модулировать динамику полимеризации актина через взаимодействие с сигнальными каскадами Rho. Кроме того, они участвуют в формировании липидных рафтов, которые могут определять характер связывания белков межклеточных контактов с плазматической

мембраной и их связь с цитоскелетом (Goni и Alonso, 2002; Bollinger *et al.*, 2005). Учитывая универсальный характер снижения F-актина в трех моделях воспаления и на пилотной выборке пациентов, представляется оправданным поиск потенциальных регуляторов динамики F-актина, таких как PREX1, и оценка их возможной роли в развитии воспаления.

В отличие от клеточных нарушений, изменения метаболизма аминокислот и ассоциированных с ними изменений поведения зависят от этиологии воспаления. С помощью модуляции состава микробиоты кишечника через совместное содержание однопометников или предоставление фукозы было показано, что ряд поведенческих изменений связан с воспалением опосредованно через изменения микробиоты и метаболизма (Strandwitz, 2018). Также обсуждается существенная роль метаболизма аминокислот как посредника в коммуникации оси «микробиота-кишечник-мозг» наряду с иммунными механизмами и взаимодействием через блуждающий нерв (Romano *et al.*, 2017; Nikolaus *et al.*, 2017; Alexeev *et al.*, 2018).

Также обсуждается потенциальная роль метаболизма летучих жирных кислот и возможная провоспалительная роль отдельных пропионат-продуцирующих бактерий в развитии колоректального рака (Wu *et al.*, 2013; Saffarian *et al.*, 2019). Показано, что исходное содержание *A. muciniphila* и *B. acidifaciens* положительно коррелирует с числом опухолей, в то время как на момент окончания эксперимента такой корреляции не наблюдается. Наибольшие различия микробиоты в исходном состоянии подтверждают модель «бактериальных драйверов-пассажира» (Tjalsma *et al.*, 2012). Эта модель постулирует, что исходный состав микробиоты служит драйвером метаболических изменений, которые определяют микробный состав в ходе развития хронического воспаления, а затем эти «бактерии-пассажиры» определяют развитие рака.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщение результатов диссертационной работы позволяет предложить интегративную модель, в которой метаболические изменения выступают в качестве одного из ключевых звеньев развития ВЗК, модулируя состояние эпителиального барьера и формирование сопутствующих кишечных и системных изменений.

На клеточном уровне одним из ключевых событий является нарушение метаболизма фосфолипидов и накопление церамидов, что наряду с митохондриальной дисфункцией и дефицитом АТФ приводит к дестабилизации актинового цитоскелета и нарушению межклеточных контактов. Это создаёт условия для транслокации бактериальных антигенов в слизистый и подслизистый слои кишечника и поддержания хронического воспаления.

На системном уровне микробиота выступает в роли метаболического органа, ассоциированного с биосинтезом нейрoактивных соединений (глицин, триптофан), способных к модуляции функций ЦНС и поведения. На уровне долгосрочных последствий исходный состав микробиоты и метаболические взаимодействия между отдельными бактериальными таксонами определяют восприимчивость к канцерогенезу, ассоциированному с воспалением.

Предложенная модель обосновывает необходимость включения метаболических мишеней в комплексную терапию ВЗК и персонализированного подхода к коррекции микробиоты на основе анализа исходного состава и метаболомного профиля. Таким образом, интеграция метаболических изменений в общую концепцию патогенеза ВЗК открывает новые перспективы для разработки терапевтических стратегий, направленных не только на подавление воспаления, но и на восстановление барьерной функции кишечника и метаболического и микробного баланса.

ВЫВОДЫ

- 1) Нарушение эпителиального барьера при хроническом воспалении кишечника сопровождается нарушением структуры актинового цитоскелета, что впервые показано на трех моделях колита *in vivo*. Ген *PREX1* был предсказан в качестве одного из потенциальных регуляторов динамики полимеризации актина при воспалении кишечника.
- 2) Впервые показано, что фармакологическое нарушение баланса полимерного и мономерного актина приводит к дефектам локализации белков плотных и адгезивных контактов на плазматической мембране *in vivo* и увеличению проницаемости эпителия в модели органоидов кишечника *in vitro*.
- 3) Впервые обнаружено, что при моделировании хронического генетически обусловленного воспаления нарушается характерное для физиологической нормы молекулярное взаимодействие белка плотных контактов клаудин-3 с актином и актин-связывающими белками в ткани кишечника *in vivo*.
- 4) Накопление церамидов в кишечном эпителии ассоциировано со снижением количества полимерного актина в модели генетически обусловленного воспаления кишечника. Впервые показано, что подавление синтеза церамидов частично восстанавливает барьерную функцию кишечника *in vivo*.
- 5) Впервые установлено, что количество бактерий *Akkermansia muciniphila* и *Bacteroides acidifaciens* в составе исходной кишечной микробиоты положительно коррелирует с восприимчивостью к воспалительному канцерогенезу в модели колоректального рака на мышах.
- 6) Показаны новые механизмы регуляции социального и тревожноподобного поведения микробиотой кишечника и ассоциированным с ней

метаболизмом триптофана и глицина на экспериментальных моделях хронического воспаления кишечника.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

1. Medvedeva S., Achasova K., Boldyreva L., Ogienko A., Kozhevnikova E. The application of explants, crypts, and organoids as models in intestinal barrier research. // *Tissue Barriers*. – 2025. – Vol. 13(3). – P. e2423137. doi: 10.1080/21688370.2024.2423137. Индексируется в SCOPUS и WOS.
2. Nickelwart E.A., Medvedeva S.S., Popova J.V., Kozhevnikova E.N. The abundance of H3K27me3 histone modification in the mouse colon under chronic inflammation. // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2025. – Vol. 61(4). – P. 1189–1199. doi: 10.1134/S0022093025040192. Индексируется в SCOPUS и WOS.
3. Achasova K.M., Snytnikova O.A., Chanushkina K.E., Morozova M.V., Tsentalovich Yu.P., Kozhevnikova E.N. Baseline abundance of *Akkermansia muciniphila* and *Bacteroides acidifaciens* in a healthy state predicts inflammation associated tumorigenesis in the AOM/DSS mouse model. // *Scientific Reports*. – 2025. – Vol. 15. – P. 12241. doi: 10.1038/s41598-025-96514-5. Индексируется в SCOPUS и WOS.
4. Achasova K.M., Kozhevnikova E.N. A cohort effect on AOM/DSS colorectal cancer model performance in C57BL/6 mice. // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2025. – Vol. 61. – P. 438–449. doi: 10.1134/S0022093025020061. Индексируется в SCOPUS и WOS.
5. Попова Ю.В., Бец В.Д., Омелина Е.С., Болдырева Л.В., Кожевникова Е.Н. Адаптация метода получения трансгенных мышей на основе *in utero* электропорации. // *Молекулярная биология*. – 2024. – Т. 58, № 6. – С. 1041–1051. doi: 10.1134/S0026893324060098. Индексируется в SCOPUS, WOS, РИНЦ.
6. Morozova M., Andrejeva J., Snytnikova O., Boldyreva L., Tsentalovich Y., Kozhevnikova E. Phospholipid supplementation inhibits male and female odor discrimination in mice. // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. – 2024. – Vol. 18. – P. e1397284. doi: 10.3389/fnbeh.2024.1397284. Индексируется в SCOPUS и WOS.
7. Andrejeva E.A., Morozova M.V., Saeidi A., Kozhevnikova E.N. Evaluation of social odor preference and social communication with the same- and opposite-sex conspecifics in male mice. // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2024. – Vol. 60(6). – P. 2517–2527. doi: 10.1134/S0022093024060292. Индексируется в SCOPUS и WOS.
8. Boldyreva L.V., Morozova M.V., Pavlov K.S., Kozhevnikova E.N. Effect of Dietary Phospholipid on the Behavior in C57BL/6J Mice. // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2024. – Vol. 60. – P. 409–419.

- doi: 10.1134/S0022093024010319. Индексируется в SCOPUS и WOS.
9. Morozova M.V., Boldyreva L.V., Borisova M.A., Kozhevnikova E.N. Investigating social communication in mice: a Two-intruders test approach. // Journal of Neuroscience Research. – 2024. – Vol. 102(7). – P. e25365. doi: 10.1002/jnr.25365. Индексируется в SCOPUS и WOS.
 10. Saydakova S., Morozova K., Snytnikova O., Morozova M., Boldyreva L., Kiseleva E., Tsentalovich Y., Kozhevnikova E. The Effect of Dietary Phospholipids on the Ultrastructure and Function of Intestinal Epithelial Cells. // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24(2). – P. 1788. doi: 10.3390/ijms24021788. Индексируется в SCOPUS и WOS.
 11. Popova J., Bets V., Kozhevnikova E. Perspectives in Genome-Editing Techniques for Livestock. // Animals. – 2023. – Vol. 13(16). – P. 2580. doi: 10.3390/ani13162580. Индексируется в SCOPUS и WOS.
 12. Morozova M., Borisova M., Snytnikova O., Achasova K., Litvinova E., Tsentalovich Y., Kozhevnikova E. Colitis-associated intestinal microbiota regulates brain glycine and host behavior in mice. // Scientific Reports. – 2022. – Vol. 12. – P. 16345. doi: 10.1038/s41598-022-19219-z. Индексируется в SCOPUS и WOS.
 13. Бец В.Д., Ачасова К.М., Борисова М.А., Кожевникова Е.Н., Литвинова Е.А. Роль гликопротеина муцин и L-фукозы во взаимодействии иммунитета и микрофлоры на примере экспериментальной модели воспалительных заболеваний кишечника. // Биохимия. – 2022. – Т. 87, № 3. – С. 356–375. doi: 10.1134/S0006297922040010. Индексируется в SCOPUS, WOS, РИНЦ.
 14. Boldyreva L.V., Morozova M.V., Saydakova S.S., Kozhevnikova E.N. Fat of the Gut: Epithelial Phospholipids in Inflammatory Bowel Diseases. // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22(21). – P. 11682. doi: 10.3390/ijms222111682. Индексируется в SCOPUS и WOS.
 15. Achasova K.M., Kozhevnikova E.N., Borisova M.A., Litvinova E.A. Fucose Ameliorates *Tritrichomonas* sp.-Associated Illness in Antibiotic-Treated *Muc2*^{-/-} Mice. // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22(19). – P. 10699. doi: 10.3390/ijms221910699. Индексируется в SCOPUS и WOS.
 16. Litvinova E.A., Bets V.D., Feofanova N.A., Gvozdeva O.V., Achasova K.M., Alperina E.L., Kozhevnikova E.N. Dietary Fucose Affects Macrophage Polarization and Reproductive Performance in Mice. // Nutrients. – 2021. – Vol. 13(3). – P. 855. doi: 10.3390/nu13030855. Индексируется в SCOPUS и WOS.
 17. Borisova M.A., Achasova K.M., Morozova K.N., Andreyeva E.N., Litvinova E.A., Ogienko A.A., Morozova M.V., Berkaeva M.B., Kiseleva E., Kozhevnikova E.N. *Mucin-2* knockout is a model of intercellular junction defects, mitochondrial damage and ATP depletion in the intestinal epithelium. // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – P. 21135. doi:

- 10.1038/s41598-020-78141-4. Индексируется в SCOPUS и WOS.
18. Borisova M.A., Snytnikova O.A., Litvinova E.A., Achasova K.M., Babochkina T.I., Pindyurin A.V., Tsentalovich Y.P., Kozhevnikova E.N. Fucose Ameliorates Tryptophan Metabolism and Behavioral Abnormalities in a Mouse Model of Chronic Colitis. // *Nutrients*. – 2020. – Vol. 12(2). – P. 445. doi: 10.3390/nu12020445. Индексируется в SCOPUS и WOS.
 19. Литвинова Е.А., Ачасова К.М., Борисова М.А., Женило С.В., Прохорчук Е.Б., Кожевникова Е.Н. Роль гена *Kaiso* в развитии воспаления у мышей с дефицитом Муцина-2. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2018. – Т. 22, № 8. – С. 1078–1083. doi: 10.18699/VJ18.453. Индексируется в SCOPUS, WOS, РИНЦ.
 20. Кожевникова Е.Н., Лещенко А.Е., Пиндюрин А.В. Индуцируемая система DamID для определения взаимодействий белка ядерной ламинаы Lamin B1 с хромосомами в клетках мыши. // *Биохимия*. – 2018. – Т. 83, № 5. – С. 763–773. doi: 10.1134/S0006297918050115. Индексируется в SCOPUS, WOS, РИНЦ.
 21. Zolotykh M.A., Kozhevnikova E.N. The effect of social experience on olfactory preference in male mice. // *Applied Animal Behaviour Science*. – 2017. – Vol. 189. – P. 1–7. doi: 10.1016/j.applanim.2017.01.013. Индексируется в SCOPUS и WOS.
 22. Litvinova E.A., Kozhevnikova E.N., Achasova K.M., Kontsevaya G.V., Moshkin M.P. Eradication of *Helicobacter* spp. in Mucin-2 deficient mice. // *Laboratory Animals*. – 2016. – Vol. 51(3). – P. 243–252. doi: 10.1177/0023677216670687. Индексируется в SCOPUS и WOS.
 23. Pindyurin A.V., Pagie L., Kozhevnikova E., van Arensbergen J., van Steensel B. Inducible DamID systems for genomic mapping of chromatin proteins in *Drosophila*. // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44(7). – P. e70. doi: 10.1093/nar/gkw176. Индексируется в SCOPUS и WOS.
 24. Литвинова Е.А., Беляев М.Д., Прохорчук А.В., Коростина В.С., Прохорчук Е.Б., Кожевникова Е.Н. Вклад кишечного муцина-2 в эффективность антибактериальной терапии *Helicobacter* spp. у лабораторных мышей. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2015. – Т. 19, № 4. – С. 494–498. doi: 10.18699/VJ15.066. Индексируется в SCOPUS, WOS, РИНЦ.
 25. Кожевникова Е.Н., Ачасова К.М., Коростина В.С., Прохорчук Е.Б., Литвинова Е.А. Роль генов *Mucin-2* и *Kaiso* в социальном поведении мышей. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2015. – Т. 19, № 4. – С. 410–412. doi: 10.18699/VJ15.053. Индексируется в SCOPUS, WOS, РИНЦ.

Автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора биологических наук.
Подписано в печать 29.06.2026.