

ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертацию Медведевой Снежанны Сергеевны
"ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА ТОЛСТОГО
КИШЕЧНИКА НА МЫШИНЫХ МОДЕЛЯХ ХРОНИЧЕСКОГО КОЛИТА",
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.22. Клеточная биология

Актуальность темы исследования. Актуальность темы исследования определяется устойчивым ростом воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), таких как язвенный колит и болезнь Крона, в странах с высоким уровнем индустриализации. С ВЗК ассоциированы такие факторы риска, как диета с высоким содержанием жирных и жареных продуктов, красного мяса и сахаров, курение, злоупотребление алкоголем, приём нестероидных противовоспалительных препаратов и оральных контрацептивов, а также воздействие загрязнённого воздуха. Не смотря на значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов ВЗК, терапевтические и хирургические стратегии не приводят к излечению, а позволяют добиться ремиссии.

Патогенез различных заболеваний связан с нарушением барьерной функции желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Слизистая оболочка ЖКТ выполняет сложные функции, выступая в качестве полупроницаемого барьера, который позволяет всасывать питательные вещества и при этом ограничивать поступление пищевых антигенов и патогенных микроорганизмов. Выполнение этой задачи достигается путем взаимодействия структурных компонентов и молекулярных механизмов, обеспечивающих транспорт различных молекул в слизистой оболочке кишечника. Работа Медведевой С.С. как раз и посвящена изучению особенностей нарушения эпителиального барьера в экспериментальных моделях хронического колита.

Дефекты барьерной функции показаны при ряде других заболеваний. В настоящее время разрабатывается ряд методов лечения, нацеленных на устранение повышенной проницаемости кишечника, параметры проницаемости все чаще используются в качестве конечных точек при оценке эффективности лечения в клинических исследованиях. В связи с этим необходимы надежные, воспроизводимые и осуществимые методы измерения проницаемости кишечника в моделях, отражающих хроническое воспаление в организме человека. С этой точки зрения, исследование автором диссертационной работы различных экспериментальных моделей *in vitro* и *in vivo* является актуальным.

Барьерная функция эпителия реализуется за счёт системы межклеточных контактов. Они регулируют прохождение метаболитов, макромолекул и ионов между клетками. Особый интерес представляет изучение субклеточной архитектуры кишечного эпителия при вялотекущем воспалении и роли цитоскелета, в частности, микрофиламентов актина, в поддержании целостности межклеточных контактов. Подобный подход позволит выявить фундаментальные механизмы, лежащие в основе нарушения барьерной функции кишечника, при хроническом воспалении, и разработать критерии диагностики и подходы лечения ВЗК. Используемые в данной работе современные методы представляются адекватным для решения поставленных задач исследования. Актуальность исследований не вызывает сомнений.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы.

В проведенном исследовании впервые были получены новые научные данные, совокупность которых определяет научную новизну диссертационной работы.

Впервые показано, что у мышей с генетически обусловленным дефицитом белка муцина-2 наблюдается нарушение локализации белков межклеточных контактов – клаудина-7, E-кадгерина и β -катенина – на латеральных мембранах энтероцитов толстой кишки при сохранении общего уровня этих белков в сравнении с животными дикого типа.

Впервые установлена зависимость организации и функции межклеточных контактов от стабильности филаментов актина. Показано, что нарушение баланса между полимерной и мономерной формами актина ассоциировано с изменением локализации клаудина-7 и β -катенина, что позволяет рассматривать микрофиламенты актина как основополагающую субклеточную структуру, обеспечивающую поддержание межклеточных контактов в эпителии толстой кишки.

Впервые продемонстрированы общие цитологические признаки повышенной проницаемости кишечного барьера в двух моделях хронического воспаления *in vivo*: генетической (Muc2^{-/-}) и химически индуцированной (приём раствора натриевой соли сульфата декстрана) - нарушение организации F-актина и локализации белков межклеточных контактов.

Дана оценка экспериментальных подходов *in vitro* и *ex vivo*, что определяет границы применения указанных моделей для изучения механизмов поддержания архитектоники кишечного барьера, а также для оценки эффективности потенциальных терапевтических воздействий.

Впервые в эпителии толстой кишки животных с дефицитом белка муцина-2 выявлено обогащение метаболитов, относящихся к фосфо- и сфинголипидам, обнаружено

нарушение регуляции экспрессии генов, ответственных за модуляцию липидного метаболизма и сборки актинового цитоскелета.

Определено, что диета с повышенным содержанием фосфолипидов оказывает выраженное негативное воздействие на функцию и ультраструктуру митохондрий в энтероцитах толстой кишки животных дикого типа.

Впервые установлено, что ингибирование синтеза церамидов с помощью фумонизина В1 приводит к восстановлению структуры F-актина и локализации β -катенина в двух моделях хронического воспаления кишечника на мышах, что говорит потенциальной терапевтической значимости 2 путей обмена сфинголипидов в регуляции барьерной функции кишечного эпителия.

Полученные в данной работе результаты имеют как фундаментальное значение в изучении молекулярных механизмов патологий кишечного барьера, так и прикладное значение для совершенствования экспериментальных моделей и разработки новых терапевтических стратегий, направленных на восстановление кишечного барьера при хронических воспалительных состояниях.

Ключевая роль структурной дезорганизации F-актина в условиях хронического воспалительного процесса при генетическом и химически-индуцированном колите позволяет выявить универсальные нарушения архитектуры цитоскелета, что расширяет современные представления о ключевой роли F-актина в поддержании целостности и функциональной состоятельности эпителиального барьера.

Сравнительное описание моделей *ex vivo* и *in vitro* формирует методологическую основу для их дальнейшего применения в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Выявленная связь между нарушениями липидного обмена и изменениями организации цитоскелета, митохондрий и межклеточных контактов в клетках эпителия толстой кишки позволяет рассматривать пути биосинтеза церамидов и фосфолипидов в качестве потенциальных мишеней для терапии повышенной проницаемости кишечника при различных заболеваниях.

Соответствие темы диссертации указанной специальности.

Диссертационная работа Медведевой С. С. соответствует паспорту специальности 1.5.22 - клеточная биология, биологические науки, в пунктах:

П. 1. Изучение строения клеток и тканей и общих закономерностей генеза, ультраструктурной организации и функции клеток эукариот, в том числе в составе тканей и органов.

П. 2. Клеточные компартменты и органеллы, их пространственная и структурно-функциональная организация. Цитоплазма, ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи, эндосомы, лизосомы и лизосомоподобные органеллы, пероксисомы, хлоропласты и другие пластиды, плазматическая мембрана, клеточная оболочка. Рибосомы. Протеасомы. Немембранные органеллы и структуры, формируемые внутренне неупорядоченными белками и РНК.

П. 17. Цитоскелет, его роль в регуляции внутриклеточных процессов. Движение клеточных органелл и клеток.

П. П.19. Клеточные технологии как основа для разработки терапевтических подходов для лечения различных патологий. Создание клеточных моделей различных заболеваний, в том числе наследственных.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности и оформления.

Диссертационная работа имеет классическую структуру и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методика экспериментов», результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Материал изложен на 116 страницах машинописного текста, включающего 2 таблицы и 18 рисунков. Список литературы представлен 294 источниками, 46% из которых опубликованы за последние 10 лет.

Во введении автор обосновывает актуальность данного исследования, формулирует цель и задачи, а также положения, выносимые на защиту; отмечает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы и степень достоверности результатов.

Цель, задачи и положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно. Представлен перечень публикаций по теме диссертации, включающий 3 статьи и 8 тезисов докладов конференций. Особое внимание уделено описанию личного вклада соискателя в выполнение исследования.

В литературном обзоре проанализирован обширный материал, посвященный строению защитного барьера кишечника, структурным компонентам кишечного барьера, межклеточным контактам эпителиального слоя, анализу механизмов нарушения барьерной функции при воспалительных процессах. Особое внимание уделено моделям ВЗК. Необходимо отметить раздел о роли липидного метаболизма при ВЗК, основанный на обзорной статье, опубликованной в соавторстве с диссертантом («Fat of the Gut: Epithelial Phospholipids in Inflammatory Bowel Diseases», *Int J Mol Sci*, 2021), которая на момент подготовки отзыва имеет более 50 цитирований. В конце по литературному обзору автор делает заключение. Представленный литературный обзор изложен логично,

отражает современное состояние исследований в данной области и убедительно демонстрирует актуальность диссертационной работы.

Во второй главе («Материалы и методика экспериментов») детально изложены все использованные экспериментальные подходы. Подробно описаны методы работы с лабораторными животными, включая модель хронического DSS-индуцированного колита, тест на проницаемость *in vivo*; цитологическая (иммуногистохимический анализ срезов толстой кишки, культивирование крипт, эксплантов и органоидов толстой кишки, просвечивающая электронная микроскопия, оценка биоэнергетического профиля клеток), молекулярная (вестерн-блот анализ, метаболомный анализ, оценка уровня экспрессии генов методом количественной ПЦР в реальном времени) части работы, а также методы статистической обработки данных.

Глава 3 «Результаты» состоит из двенадцати разделов, логически выстроенных в соответствии с поставленными задачами, и посвящена комплексному анализу свойств эпителиального барьера толстой кишки. Первые два раздела посвящены оценке распределения белков межклеточных контактов (клаудина-7, E-кадгерина и β -катенина) в эпителии толстой кишки и в органоидах, полученных из крипт толстой кишки, при хроническом воспалении, ассоциированном с дефицитом белка муцина-2. Далее проанализирована применимость различных *in vitro* и *ex vivo* объектов (органоиды, изолированные крипты и экспланты) для изучения свойств эпителиального барьера. В 6 разделе автор исследует организацию F-актина и межклеточных контактов в эпителии толстой кишки на другой модели хронического колита, индуцированного DSS. Проведено метаболомное профилирование крипт толстой нисходящей кишки мышей Muc2^{+/+} и Muc2^{-/-} с использованием тандемной масс-спектрометрии с анализом уровня фосфо- и сфинголипидов. Разделы 8-9 посвящены эффекту воздействия экзогенных фосфолипидов, а в главах 10-12 изучается влияние экзогенного церамида С6 и эффект ингибирования церамидсинтаз на актиновый цитоскелет и межклеточные контакты в эпителии толстой кишки в моделях *in vivo*. Необходимо отметить, что основная часть экспериментальных данных в диссертации получена в условиях *in vivo*, что повышает их физиологическую значимость. Результаты исследования подробно иллюстрированы наглядным материалом.

Глава 4 «Обсуждение» состоит из четырех разделов, в которых автор последовательно анализирует и интерпретирует полученные результаты в контексте известных литературных данных. Особый интерес представляет обсуждение роли липидов, включающее анализ связи фосфолипидов с функцией митохондрий, участия церамидов в регуляции проницаемости кишечного барьера и свойств церамид-

содержащих липидных рафтов. Обсуждение позволяет сформировать достаточно полное представление о проделанной работе.

Обоснованность научных положений, достоверность выводов и заключений диссертационной работы.

Обоснованность научных положений, достоверность полученных в диссертационном исследовании результатов и сделанных автором выводов основывается на логичности построения и тщательной проработке всех этапов исследования, выборе адекватных экспериментальных моделей и биологического материала для исследования, использовании современных информативных методов лабораторного анализа, корректном сопоставлении полученных данных и статистической обработке результатов. Материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на научных форумах и представлены в авторитетных международных научных изданиях, что свидетельствует о высоком уровне и научной значимости работы. Выводы, сделанные автором, логично вытекают из результатов, основаны на полученном фактическом материале, отражают суть проведенного диссертационного исследования и соответствуют поставленной цели и задачам. Указанное позволяет считать, что представленные автором результаты являются достоверными, а выводы обоснованными.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с существующими требованиями, полностью отражает основное содержание диссертации.

В целом диссертация производит благоприятное впечатление. Полученные данные характеризуются новизной. Работа выполнена на высоком методическом уровне, логично выстроена, написана хорошим литературным языком, что свидетельствует о высокой квалификации автора и позволяют охарактеризовать С.С. Медведеву как сформировавшегося исследователя, способного к самостоятельной научной деятельности.

Существенных замечаний, которые могли бы повлиять на научную ценность представленной работы, нет.

При ознакомлении с диссертацией возникли следующие вопросы:

1. Существует понятие кишечного гомеостаза. Что он включает и какова роль других факторов в барьерной функции кишечника?

3. Если структура F-актина в клетках определяет функцию белков плотных контактов, существуют ли способы воздействия на F-актин (например, ингибирование церамидсинтаз, или другие подходы)?

2. Не смотря на внушительный список литературных источников, работы российских авторов представлены в незначительном количестве. Скажите, пожалуйста, много ли исследований проводится в нашей стране?

Заключение. Диссертационная работа Медведевой Снежанны Сергеевны "Особенности нарушения эпителиального барьера толстого кишечника на мышинных моделях хронического колита", выполненная под руководством кандидата биологических наук Кожевниковой Елены Николаевны, является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научно-методологическом уровне с использованием современных методов исследования, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи, имеющей существенное значение для клеточной биологии – изучены клеточные и метаболические особенности нарушения эпителиального барьера на мышинных моделях хронического колита. Диссертационная работа по содержанию, актуальности, новизне, методическому уровню, практической и теоретической значимости полученных результатов полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённых постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (со всеми последующими редакциями), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, соответствует заявленной специальности 1.5.22. Клеточная биология, а её автор, Медведева Снежанна Сергеевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, руководитель
лабораторией клеточных технологий,
Института клинической и экспериментальной
лимфологии – филиала Института цитологии
и генетики Сибирского отделения РАН,
г. Новосибирск

 Повещенко Ольга Владимировна

Дата 23 декабря 2025г.

Контактные данные:

630117 Новосибирск, ул. Арбузова, 6 НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН
8 (383) 335-93-32
poveschenkoov@yandex.ru
Повещенко Ольга Владимировна

подпись О. В. Повещенко заверяю
ученый секретарь НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН,
кандидат биологических наук



 Соловьева Анастасия Олеговна