

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу *Медведевой Снежанны Сергеевны* на тему:
«Особенности нарушения эпителиального барьера толстого кишечника на мышинных моделях хронического колита», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
1.5.22. Клеточная биология

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Медведевой С.С. посвящена актуальной проблеме современной биомедицины – изучению клеточных и молекулярных механизмов нарушения барьерной функции кишечного эпителия при хроническом воспалении, что является ключевым звеном в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника и ряда других патологических состояний.

Барьерная функция является одной из фундаментальных для эпителиальных тканей и регулируется комплексом молекулярных и клеточных механизмов, основным из которых является формирование межклеточных контактов, которые определяют полярность эпителиальной ткани и ее функциональную состоятельность.

Механизмы нарушения структуры межклеточных контактов, таким образом, представляют несомненный интерес в фундаментальном плане, а также для идентификации мишеней для борьбы с повышенной проницаемостью кишечного эпителия, в том числе при хроническом воспалении, которое, как справедливо отмечено в диссертации, с этой точки зрения изучено недостаточно.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы

В диссертационной работе проведена критическая оценка границ применимости экспериментальных систем (*ex vivo* экспланты, *in vitro* органоиды, изолированные крипты) для моделирования и изучения нарушений функций эпителиального барьера. Показано, что ингибирование биосинтеза церамидов приводит к восстановлению структуры F-актина, частичной нормализации локализации некоторых белков адгезивных контактов и снижает проницаемость эпителиального барьера *in vivo*.

Получены новые данные о влиянии диеты, обогащенной фосфолипидами, на ультраструктуру и функцию митохондрий энтероцитов, что расширяет понимание взаимосвязи липидного метаболизма и клеточного гомеостаза в кишечнике.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности и оформления

Диссертационная работа изложена на 116 страницах, имеет классическую структуру: Введение, Обзор литературы (4 раздела и заключение), Материалы и методика экспериментов, Результаты (12 разделов), Обсуждение (4 раздела), Заключение, Выводы, Список литературы (294 источника, почти половина из которых – статьи за последние 10 лет), 18 иллюстраций и 2 таблицы в основном тексте.

Диссертация предваряется трехстраничным перечислением сокращений, что облегчает восприятие текста.

Во Введении автор подробно описывает актуальность выбранной темы и определяет цель и задачи исследования, выделяет научную новизну, теоретическое и практическое значение, формулирует положения, выносимые на защиту, и предоставляет список публикаций результатов диссертации, состоящий из 3 статей (из них первым автором – 2 публикации) и 8 тезисов конференций.

Цель исследования, задачи, а также положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно, хотя несколько неожиданной выглядит задача по ультраструктурному и функциональному анализу митохондрий.

Достаточно подробно описан **личный вклад автора**, который включает весь процесс получения данных, выполнение цитологических методов (приготовление цитологических препаратов с их последующим непрямым иммуноокрашиванием и визуализацией на конфокальном микроскопе, электронно-микроскопический анализ), культуральных работ (выделение тканей, крипт из тканей животных, культивирование эксплантов и органоидов, оценка проницаемости *in vitro*), работа с животными (получение химически индуцированной модели хронического колита, ректальное введение веществ, оценка проницаемости *in vivo*).

Также представлен перечень экспериментов, выполненных автором совместно с другими исследователями на базе научных центров страны: оценка экспрессии целевых белков методом вестерн-блот анализа; метаболомный анализ ткани толстой кишки методом масс-спектрометрии; анализ данных метаболомного профилирования; проведение экспериментов по краткосрочному и длительному кормлению животных фосфолипидами; часть экспериментов по получению и культивированию органоидов; оценка потребления кислорода криптами кишки с помощью системы Seahorse Agilent HF.

Перечисленные компетенции позволяют оценить квалификацию автора как высокую и дают основание считать, что С.С. Медведева является зрелым исследователем, способным к самостоятельной научной работе.

В Главе 1. «Обзор литературы» автор дает подробное описание строения защитного барьера кишечника, а именно, муцинового слоя, эпителия толстой кишки и субэпителиального барьера. Далее автор концентрируется на описании нарушений работы кишечного барьера при воспалении и представляет обзорный анализ двух моделей воспалительных заболеваний кишечника: колита, индуцированного натриевой солью сульфата декстрана (DSS) и трансгенной моделью с нокаутом гена *Muc2*. Отдельно следует выделить раздел «1.4. Метаболизм липидов при воспалительных заболеваниях кишечника», основанный на опубликованном в соавторстве с диссертантом обзоре «Fat of the Gut: Epithelial Phospholipids in Inflammatory Bowel Diseases» (Int J Mol Sci; 22(21):11682. doi: 10.3390/ijms222111682), который на момент написания отзыва имеет более 50 цитирований.

Представленный обзор позволяет оценить современное состояние исследований в данной области биологии и сделать заключение об актуальности темы диссертационного исследования.

В Главе 2. «Материалы и методика экспериментов» содержится подробное описание всех методов, используемых в диссертации, включая работу с лабораторными животными (описание исследуемых линий мышей, условий их содержания, получение животных с хроническим DSS-индуцированным колитом, введение фосфолипидов в диету мышей, ректальное введение веществ, тест на проницаемость *in vivo*), описание цитологических методов (иммуногистохимический анализ срезов толстой кишки, культивирование крипт, эксплантов и органоидов толстой кишки, просвечивающая электронная микроскопия, оценка биоэнергетического профиля клеток, тест на проницаемость *in vitro*), молекулярных методов (вестерн-блот анализ, метаболомный анализ, оценка уровня экспрессии генов методом количественной ПЦР в реальном времени), а также статистическую обработку данных.

Глава 3. «Результаты» включает двенадцать разделов, каждый из которых посвящён изучению свойств эпителиального барьера толстой кишки. Соискатель описывает нарушения локализации белков плотных и адгезивных контактов клаудина 7, β -катенина и E-кадгерина в эпителии толстой кишки животных с нокаутом гена *Muc2*, предполагая, что это вызвано снижением уровня филаментного актина (F-актина).

Также диссертация содержит результаты, описывающие применимость различных *in vitro* и *ex vivo* моделей (органоиды, изолированные крипты и экспланты) для изучения свойств эпителиального барьера на клеточном уровне. Согласно им, органоиды, полученные из крипт толстой кишки животных *Muc2*^{-/-}, не воспроизводят ранее показанные в этой модели нарушения локализации белка клаудина 7. Соискателем показано, что крипты не способны длительное

время поддерживать структурную целостность эпителия, однако *ex vivo* экспланты, культивируемые на границе «воздух-среда», сохраняют жизнеспособность и структуру на протяжении 18 часов. Тем не менее, основная часть исследования выполнена *in vivo*, позволяя получить результаты, наиболее приближенные к живым организмам.

Нарушения, аналогичные обнаруженным в модели *Muc2^{-/-}*, были обнаружены и в модели хронического колита, индуцированного DSS. Используя метод тандемной масс-спектрометрии, были получены метаболомные профили крипт, выделенных из толстой нисходящей кишки мышей линий *Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}*, которые выявили повышенное содержание фосфо- и сфинголипидов у *Muc2^{-/-}* мышей.

С.С. Медведевой было показано, что повышение уровня фосфолипидов в диете животных дикого типа приводит к нарушению ультраструктуры и дыхания митохондрий в энтероцитах толстой кишки, но не вызывает нарушения кишечного барьера. Ректальное введение мицелл церамида С6 нарушает иммуногистохимическую картину локализации F-актина и β-катенина у животных дикого типа, в то время как воздействие ингибитора церамидсинтаз фумонизина В1 приводит к обратному результату как в модели *Muc2^{-/-}*, так и у животных с DSS-индуцированным колитом, тем самым восстанавливая нормальный фенотип эпителиального барьера. Важным подтверждением полученных результатов выступает снижение паталогической проницаемости в толстой кишке после ректального введения *Muc2^{-/-}* мышам фумонизина В1.

Глава 4. «Обсуждение» разбита на четыре раздела, посвящённые основным темам диссертации: использование *ex vivo* и *in vitro* моделей для изучения эпителиального барьера, изменения в локализации белков межклеточных контактов и экспрессии соответствующих генов на фоне воспаления, связи белков межклеточных контактов и нарушения динамики F-актина, и роли липидного метаболизма в поддержании барьерной функции эпителия кишки.

Соискатель подчеркивает, что большая часть исследований эпителиального барьера сделана на моделях острого, впервые начавшегося воспаления, в то время как данных о хроническом воспалении, характерного для периода ремиссии ВЗК, значительно меньше.

Отдельного внимания заслуживает раздел о липидах, состоящий из трёх подразделов: связи фосфолипидов со структурой и функцией митохондрий, роли церамидов в регуляции проницаемости кишечного барьера и свойств церамид-содержащих липидных рафтов. Эти пункты охватывают полученные результаты в полной мере и позволяют предположить механизмы, по которым церамиды могут вызывать нарушение эпителиального барьера.

Изложение результатов и их обсуждение соответствует поставленным задачам.

Обоснованность научных положений, достоверность выводов и заключений диссертационной работы

Диссертационная работа выполнена в соответствии с поставленными задачами и проведена на высоком научно-методическом уровне с использованием современных методов клеточной биологии, среди которых методы культивирования органоидов и эксплантов, иммуногистохимия, электронная микроскопия, вестрен-блоттинг, различные функциональные тесты, метод ПЦР, метаболомный анализ.

Высокая степень достоверности и обоснованности результатов диссертационной работы достигнута также благодаря объемам экспериментальных групп и адекватному статистическому анализу данных.

Общие вопросы и замечания по работе

1. Автор убедительно показывает, что нарушение стабильности филаментов актина ведет к изменению структуры межклеточных контактов. Однако связь контактов с актиновыми филаментами давно известна. В чем конкретно заключается новизна данного наблюдения?
2. Почему возникла идея исследования метаболомного профиля кишечника? Как накопление липидов связано с нарушением эпителиального барьера? Не является ли это следствием воспалительных процессов или иных нарушений?
3. Почему при исследовании воздействия избытка экзогенных фосфолипидов на эпителий кишечника животных дикого типа была применена электронная микроскопия и исследованы именно митохондрии, в то время как на других моделях использовали иммуногистохимию и исследовали межклеточные контакты?
4. Как будет влиять на структуру межклеточных контактов у использованных модельных животных противовоспалительная терапия? Есть ли данные по этому поводу в литературе?

Заключение

Диссертационная работа Медведевой Снежанны Сергеевны на тему: «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.

Результаты, полученные в работе, имеют высокую значимость для решения проблем клеточной биологии.

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:

Заведующий лабораторией клеточной биологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
доктор биологических наук, член-корреспондент РАН

Воротеляк Екатерина Андреевна

17.12.2025

«Подпись Воротеляк Екатерины Андреевны заверяю»:

Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
кандидат биологических наук



Хабарова Марина Юрьевна

Адрес места работы:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
119334, Москва, ул. Вавилова, д.26

Должность: заведующий лабораторией клеточной биологии

Телефон: 8 (499)135-33-22

E-mail оппонента: info@idbras.ru