

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата биологических наук Блиновой Елены Андреевны на диссертационную работу Ачасовой Ксении Михайловны «Роль гликопротеина муцина<sup>2</sup> и его структурного компонента фукозы в регуляции барьерной функции кишечника», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 - физиология

**Актуальность избранной темы.** Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) разнообразны и являются распространенной в мире группой заболеваний с не до конца выясненным механизмом запуска и комбинацией множества триггерных факторов. Современные представления выделяют отдельную роль в патогенезе ВЗК генетическим факторам и факторам окружающей среды, к которым относятся изменения в составе микробиоты и повышенная проницаемость кишечника. В норме микробиота кишечника, представленная динамичным сообществом более 400 различных видов бактерий, грибов, обеспечивает метаболизм пищевых компонентов, участвует в синтезе витаминов, трофике кишечного эпителия, формирует барьер, защищающий кишечник от колонизации патогенных микроорганизмов. Активно обсуждается взаимосвязь микробиоты кишечника и иммунного ответа хозяина в патогенезе ассоциированных с воспалением заболеваний, включая аутоиммунные патологии и ВЗК. Известно, что как микробиом значительно влияет на структуру и функции иммунной системы, так и иммунная система оказывает влияние на состав и свойства микробиома. Барьерная функция эпителия кишечника поддерживается клетками врожденной иммунной системы, физиологическое состояние кишечника обеспечивается балансом между эффекторными и регуляторными Т-клетками, распознающими антигены собственной микрофлоры. Вопрос о том, может ли дисбиоз кишечника быть причиной развития ВЗК, или следствием заболевания, является в научном сообществе предметом дискуссии.

Исследованию ВЗК способствует разработка различных животных моделей, которые позволяют расшифровать воспалительные процессы на разных стадиях (острая, хроническая), ранние и поздние события, изменения в структуре кишечника, и конечно, оценивать терапевтические подходы к лечению. Животные модели ВЗК можно разделить на различные категории: антиген-индуцированные, бактерия-индуцированные, индуцированные химическими, иммунологическими или физическими факторами, адоптивные модели переноса Т-клеток, спонтанные и генетические (трансгенные и нокаутные). С развитием биоинженерии в последние десятилетия наибольшее распространение получили генетические модели, одной из которых является модель с нокаутом гена муцина 2.

Основные терапевтические подходы к лечению ВЗК направлены на подавление воспаления, а также на модуляцию микробиоты кишечника. Воздействие на микробиоту может достигаться антибактериальными препаратами, про- и пребиотиками, изменением характера диеты. Поскольку клиническая картина ВЗК достаточно мозаична, предсказать

ответ на терапию и ее эффективность у пациентов является сложной задачей. Поиск исследователей сосредоточен на биологических соединениях, позитивно воздействующих на бактериальный состав в кишечнике и осуществляющих протективную функцию, поддерживающих гомеостаз в кишечнике. Таким соединением потенциально может быть фукоза. Исходя из указанных аспектов, обоснованно выбранная автором модель для исследования (линия мутантных мышей по муцину 2) и четко поставленные диссертантом задачи определили высокую актуальность диссертационной работы К.М. Ачасовой, как для фундаментальной науки, так и для дальнейшего развития терапевтических подходов в клинической практике.

**Научная новизна исследований.** При выполнении диссертационной работы автором были получены новые результаты, дополняющие существующие знания в исследуемой области.

Показано, что вследствие генетически обусловленного дефицита муцина 2 у мышей в кишечнике происходит нарушение барьерной функции, появляются признаки воспаления, что снижает устойчивость данной линии к разрастанию простейшего *Tritrichomonas sp.* На фоне антибактериальной терапии, приводящей к нарушению микрофлоры, наблюдается истощение и гибель *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей с инфекцией *Tritrichomonas sp.*; мыши, свободные от инфекции, как и мыши с муциновым слоем в кишечнике в данных условиях выживают. Что демонстрирует протективную функцию бактериальной микрофлоры в отношении протозойной инфекции в условиях нарушенного барьера кишечника и воздействия антибактериальных препаратов. В работе впервые было получено разнонаправленное действие антибактериальной терапии на бактериальную микрофлору в генетической модели ВЗК в зависимости от наличия протозойной инфекции. В результате исследования автором впервые обнаружено, что моносахарид L-фукоза способствует угнетению *Tritrichomonas sp.* и сохранению жизнеспособности *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей с дефицитом муцина 2, рожденных с инфекцией.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные результаты расширяют имеющиеся знания о патогенезе ВЗК, а именно пониманию механизмов развития хронического воспаления в кишечнике с генетически обусловленной нарушенной барьерной функцией, взаимосвязи микробиома с функционированием иммунной системы. Не менее важным теоретическим и практическим результатом работы можно считать неблагоприятные последствия антибактериальной терапии у индивидов с нарушениями барьерной функции кишечника в присутствии протозойной инфекции, которые могут привести к более тяжелому течению патологии и дальнейшему снижению ответа пациента на антибактериальную терапию. Возможно, последующие дополнительные исследования установят роль протозойных инфекций в патогенезе ВЗК и позволят скорректировать назначаемую терапию.

Практическим результатом работы является получение новых данных об угнетающем действии входящего в состав муцина 2 моносахарида L-фукозы на *Tritrichomonas sp.*, которые могут внести вклад в разработку новых подходов регуляции

патологических состояний, связанных с возбудителями родов *Tritrichomonas* и *Trichomonas* как у человека, так и у сельско-хозяйственных, домашних животных.

### **Общая характеристика работы, завершенность и качество ее оформления.**

Диссертационная работа К.М. Ачасовой написана в традиционном стиле и содержит введение, обзор литературы, главу, в которой описаны материалы и методы исследования, главу с изложением собственных исследований, обсуждения результатов, заключение, выводы и библиографический список, а также раздел приложение, куда вынесены результаты, не вошедшие в основной раздел. Работа изложена на 156 страницах печатного текста, хорошо иллюстрирована, включает 1 таблицу и 27 рисунков. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 255 литературных источников, из них 1 отечественную публикацию.

Во введении представлены все необходимые подразделы, обоснована актуальность исследования, сформулированы цель и задачи, отражена научная новизна исследования, его теоретическая и практическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту, приводятся сведения об апробации полученных результатов.

Литературный обзор хорошо написан, информативен, достаточно полно охватывает имеющиеся современные данные литературы в рамках тематики исследования, проиллюстрирован 1 рисунком, что облегчает восприятие текста обзора и говорит о высокой профессиональной подготовке автора.

В главе «Материалы и методы» описан дизайн экспериментов и особенности применения физиологических, иммунологических и молекулярно-генетических методов исследования. Выбор применяемых подходов согласуется с поставленными задачами. Работа проведена с использованием комплекса методов на современном оборудовании, что значительно повысило информативность и достоверность полученных автором результатов. Статистическая обработка полученных данных автором проведена корректно, с использованием адекватных методов статистического анализа.

Результаты собственных исследований изложены в третьей главе по разделам, расположенным в логической последовательности в соответствии с поставленными задачами. В разделе 3.1 описаны результаты о влиянии дефицита муцина 2 на показатели иммунного статуса мышей: IgA, IgG против собственной микрофлоры в кишечнике, экспрессия факторов, связанных с воспалением. В разделе 3.2 приведено сравнение воздействия антибиотиков и L-фукозы на микрофлору мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* и C57BL/6. Раздел 3.3 посвящен влиянию антибиотиков на микрофлору *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей, свободных от инфекций. В разделе 3.4 приведено сравнение мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* и *Muc2<sup>+/+</sup>*, рожденных с инфекцией и без нее по показателям иммунной системы: число T-регуляторных клеток, субпопуляций T-клеток, B-клеток, концентрации IgA, IgG в крови. В разделе 3.5 описаны результаты по выживаемости мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* при обеднении бактериальной микрофлоры и элиминации *Tritrichomonas sp.* В разделе 3.6 отражен анализ микрофлоры кишечника мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* при приеме антибиотиков и L-фукозы. В разделе 3.7 посвящен влиянию обеднения микрофлоры на иммунный статус мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* с инфекциями и без. Все

разделы собственных результатов хорошо проиллюстрированы рисунками и таблицами, которые отражают объем и качество полученного фактического материала. Грамотный анализ экспериментальных данных обосновывает сформулированные научные положения и выводы.

Отдельно хочу отметить главу «Обсуждение», в которой продемонстрирован анализ полученного комплекса данных и сравнение собственных результатов с литературными данными. Автору особенно удалось написать данную главу, видно владение материалом по теме исследования. В заключении приводится обобщение полученных результатов. Работа завершается выводами, которые адекватны полученным результатам и полностью соответствуют поставленным задачам.

Автореферат написан по требуемой форме, соответствует содержанию диссертации и содержит всю необходимую информацию.

**Обоснованность и достоверность научных положений, выводов.** Достоверность и обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в работе не вызывает сомнений. Что подтверждается достаточным количеством экспериментальных животных, формированием экспериментальных и контрольных групп в соответствии с задачами исследования, комплексом современных методов исследования, включающих сочетание физиологических, иммунологических и молекулярно-генетических подходов.

Результаты, представленные в диссертационной работе К.М. Ачасовой обсуждены на российских и международных научных конференциях в виде устных и постерных докладов, автором опубликовано 9 научных статей в рецензируемых отечественных и международных журналах, входящих в базу данных Web of Science, Scopus.

#### **Замечания по диссертационной работе.**

В тексте диссертации встречаются опечатки, пропущенные предлоги, несогласованность падежей и неудачные фразы (например, «...анализ экспрессии некоторых генов»). Однако они являются единичными и не сказываются на понимании и восприятии диссертационной работы в целом. В качестве замечания можно отметить формулировку третьего положения, которая содержит элементы обсуждения, что не соответствует общепринятым правилам. Просьба к автору в последующем быть более внимательным при формулировании основных научных положений. Все указанные замечания не являются критическими и не являются препятствием к защите.

При прочтении работы возникло несколько вопросов:

1. Как вы считаете, может ли быть связано перераспределение субпопуляций Т-клеток в сторону CD8<sup>+</sup> лимфоцитов у *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей после антибиотиков с активацией цитотоксического иммунного ответа? Ведь антибиотики приводят к нарушению баланса микрофлоры и размножению грибковых микроорганизмов.
2. Снижение клеточности в тимусе, селезенке связано больше с обеднением микрофлоры или с приемом антибиотиков? Как антибиотики действуют на Т-лимфоциты и тимоциты?

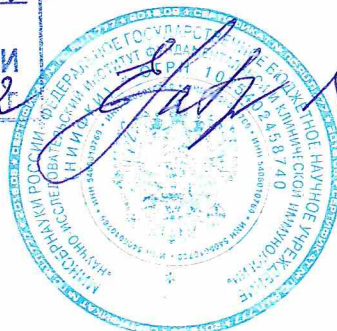
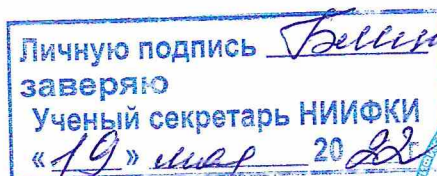
3. Скажите, можно ли полученные вами данные об угнетении протозойной инфекции у мышей с генетически обусловленным нарушением барьерной функции кишечника экстраполировать на пациентов? Стоит ли пациентам с ВЗК назначать, например, пероральный прием фукозы в дополнение к антибиотикам?

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, диссертация Ачасовой Ксении Михайловны «Роль гликопротеина муцина2 и его структурного компонента фукозы в регуляции барьерной функции кишечника» по своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости полностью соответствует пунктам 9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (в ред. Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 N 335, от 02.08.2016 N 748, от 29.05.2017 N 650, от 28.08.2017 N 1024, от 01.10.2018 N 1168) предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Официальный оппонент  
с.н.с лаборатории клинической  
иммунопатологии НИИФКИ, к.б.н

Блинова Е.А.



Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)  
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14,  
Тел.: 8-(383)-221-01-35, email: eablinova@niikim.ru