

## ОТЗЫВ

Официального оппонента, доктора биологических наук Вахитова Тимура Яшеровича, Главного научного сотрудника Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ») на диссертационную работу Ачасовой Ксении Михайловны «Роль гликопротеина муцина<sup>2</sup> и его структурного компонента фукозы в регуляции барьерной функции кишечника», представленную в диссертационный совет Д 001.014.02 при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

### Актуальность темы

Диссертационная работа Ксении Михайловны Ачасовой посвящена решению важной проблемы физиологии и медицины. Актуальность темы не вызывает сомнений, поскольку барьерная функция – одна из важнейших функций кишечника. В сочетании с транспортной функцией, барьерная функция позволяет эпителию кишечника служить эффективным интерфейсом взаимодействия двух частей суперорганизма человека – микробиоты и хозяина. Нарушение барьерной функции кишечника предрасполагает к появлению воспалительного заболевания (ВЗК) и сопровождается нарушением состава микробиоты, тесно связанной с поверхностью кишечника механическими, регуляторными и трофическими связями.

Согласно современной классификации ВОЗ, воспалительные заболевания кишечника входят в список основных хронических неинфекционных заболеваний (ХНИЗ) человека наряду с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, раком, диабетом 2 типа и некоторыми другими. Во всем мире ВЗК страдают около 6,8 миллионов человек, причем заболеваемость неуклонно растет, особенно в индустриальных странах.

Этиология ВЗК включает в себя сочетание генетических триггеров и факторов окружающей среды. Поставленные в диссертации вопросы касаются понимания детерминант возникновения, тяжести и рецидива/ремиссии ВЗК, что является ключом к разработке диагностических и терапевтических стратегий для лечения болезни. Микробиота кишечника может играть ведущую роль в проявлении и лечении заболевания. В частности, определенные бактерии способны продуцировать метаболиты, модулирующие патогенез воспалительного заболевания путем непосредственного воздействия на эпителий кишечника. Понимание механизмов, с помощью которых микробы вносят свой вклад в патогенез ВЗК, может помочь в разработке новых методов лечения с использованием бактерий или их метаболитов.

Барьерные функции кишечника во многом определяются наличием слизистого слоя (геля), покрывающего его эпителий. Для одних бактерий этот слой является благоприятной средой обитания, поскольку в силу своих биохимических особенностей они способны разжижать его, проникать внутрь слоя и использовать его компоненты в качестве источника питания. При этом они выделяют соединения (например, короткоцепочечные жирные кислоты), которые стимулируют

производство гелевых структур клетками эпителия. Другие бактерии не способны разжижать гель. По этой причине, а также благодаря наличию в составе геля антимикробных факторов хозяина (иммунные клетки, дефензины, иммуноглобулины и т.д.) или микробиоты (бактериоцины, бактериофаги, вирусы, антибиотики, низкомолекулярные регуляторы чувства кворума и пр.), они остаются в просвете кишечника и со временем вымываются из него. Слизь избирательно пропускает не только бактерии, но и молекулы. Благодаря деятельности эпителиальных клеток и клеток микроорганизмов в толщине слизи создаются потоки и градиенты концентраций низкомолекулярных метаболитов, обладающих, в том числе, свойствами аттрактантов или репеллентов для бактерий или/и иммунных клеток хозяина. Благодаря этому те и другие клетки постоянно перемещаются по направлению к местам, где их нахождение в данный момент наиболее востребовано.

Основным компонентом эпителиальной слизи является муцин<sup>2</sup>, который содержит белковую и углеводную часть и может служить средой обитания и пищевым субстратом для микроорганизмов кишечника. Бактерии, способные разрушать муциновый слой и утилизировать его компоненты, имеют селективные преимущества перед иными бактериями. В составе муцина особенно важны остатки сахаров, находящихся в терминальном положении олигосахаридов, поскольку именно они наиболее доступны для бактерий и клеток иммунитета хозяина. Одним из таких моносахаридов является фукоза, которая дополнительно выполняет функции важного фактора во взаимодействии хозяин-микроб, в том числе за счет регуляции распознавания некоторых паттернов бактерий и хозяина.

Нарушение обмена фукозы (например, фукозилирования) в кишечнике может приводить к изменению состава микробиоты и снижению устойчивости к колонизации патогенами. На основе литературных данных автор диссертации обоснованно полагает, что экзогенная фукоза, а также вещества, её содержащие, способны положительно влиять на микробиоту и иммунную функцию в кишечнике. Дальнейшее изучение свойств фукозы может быть основой для разработки новых способов модуляции кишечной микрофлоры.

Таким образом, тема диссертации Ачасовой К.М. имеет высокую актуальность как в области медицины и здравоохранения, так и в решении фундаментальных вопросов взаимодействия хозяина и микробиоты.

### **Научная новизна**

Диссертационная работа Ачасовой Ксении Михайловны обладает высокой научной новизной. В работе был использован широкий комплекс современных генетических, иммунологических, молекулярно-биологических, биохимических и биоинформационных методов для исследования фундаментальных вопросов взаимодействия хозяина и микробиоты. Все проведенные эксперименты отличаются оригинальным авторским дизайном. В работе получены новые данные относительно физиологических особенностей мышей с нокаутом гена муцина<sup>2</sup>, то есть имеющих нарушенную слизистую оболочку кишечника.

В изящных экспериментах с использованием FITC-декстрана с молекулярной массой 4kDa диссертант показал, что у этих мышей проницаемость кишечного барьера приблизительно в 5 раз выше, чем у мышей без мутации. К.М. Ачасовой впервые продемонстрировано, что мутантные мыши, в отличие от немутантных, неустойчивы к инфекции *Tritrichomonas* sp., поскольку слой муцина у них разрушен и не препятствует связыванию цитотоксических *Tritrichomonas* sp. с клетками эпителия. В работе получены многочисленные доказательства того, что дефицит муцина<sup>2</sup> приводит к развитию хронического воспаления.

В опытах с добавлением в пищу антибиотиков впервые наглядно показано, что при наличии дефектов муцинового слоя определенную нагрузку в защите животного от инфекции принимает на себя его микробиота.

Впервые с использованием *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей показано, что антибиотики оказывают разнонаправленное действие на бактериальную микробиоту в зависимости от присутствия протозойной инфекции. Под действием антибиотиков количество бактерий в кишечнике во всех случаях уменьшалось, однако видовое разнообразие бактерий у мышей с инфекцией *Tritrichomonas* sp. при этом увеличивалось, а у мышей без инфекции – уменьшалось.

Впервые установлено, что на фоне нарушения бактериальной микрофлоры L-фукоза – способствует угнетению *Tritrichomonas* sp. в кишечнике мышей.

### **Практическая и теоретическая значимость работы**

Теоретическая значимость работы определяется, прежде всего, её весомым вкладом в понимание фундаментальных вопросов взаимодействия хозяина и микробиоты. В практическом плане полученные Ачасовой К.М. результаты являются серьезным вкладом в изучение патогенеза ВЗК. Выявленные особенности иммунного статуса *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей могут способствовать пониманию механизмов развития хронического воспаления в кишечнике с нарушенной барьерной функцией, причем это касается не только нарушений, вызванных генетическими причинами. Аналогичные нарушения могут возникать под действием смены питания, климата, лекарственных препаратов, стрессовых факторов. Кроме этого, результаты исследования наглядно показывают, что осложнения, вызванные антибиотиками (или аналогичными препаратами), в значительно большей степени проявляются у пациентов с нарушениями барьерной функции, а также при наличии протозойной или другой латентной инфекции. В свете полученных данных становится очевидной необходимость более подробного изучения обитающих в кишечнике простейших и других микроорганизмов и их влияния на физиологию хозяина.

В исследовании продемонстрировано угнетающее действие L-фукозы на развитие *Tritrichomonas* sp. Эти результаты могут стать основой для разработки новых способов и схем лечения патологических состояний, связанных с представителями родов *Tritrichomonas* и *Trichomonas*, которые являются

возбудителями заболеваний мочеполовой системы и желудочно-кишечного тракта человека, сельскохозяйственных и домашних животных.

### **Степень достоверности и обоснованности научных положений диссертационной работы**

Результаты диссертационного исследования достоверны, научные положения обоснованы. Данные получены на современном сертифицированном оборудовании, показана и подтверждена воспроизводимость результатов. Выбраны адекватные объекты, цели и сформулированы логичные и четкие задачи исследования. В работе использованы экспериментальные методики высокого технологического уровня, выбранные методологии в полной мере обоснованы. Выводы и рекомендации корректны, в полной мере отражают полученные результаты. Достоверность результатов исследования обеспечена также соответствием результатов теоретическим положениям и результатам других исследователей. Значимость полученных данных подтверждена методами математической статистики и биоинформатики.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на 5 конференциях, в том числе 2-х международных, проводившихся в Японии (2017) и Австрии (2019).

По материалам диссертации опубликованы 11 работ в изданиях, рекомендованных ВАК, 9 из них индексируются в WOS и SCOPUS.

### **Оценка содержания и структура диссертации**

В диссертации присутствуют все разделы, рекомендованные ВАК РФ.

Работа изложена на 156 страницах и состоит из введения (6 стр.), 4-х глав основной части: обзор литературы (19 стр.), материалы и методы (22 стр.), результаты (39 стр.), обсуждение результатов (20 стр.), а также заключения, выводов, списка литературы (255 источников) и 14 приложений на 13 страницах. Основной текст диссертации иллюстрирован 29-ю рисунками, 3-мя таблицами. Дополнительные рисунки и таблицы приведены в приложениях.

Во введении имеются все необходимые подразделы, четко сформулирована **цель работы**: выявить роль муцина2 и его компонента – моносахарида L-фукозы в регуляции барьерной функции кишечника.

Для достижения этой цели автор ставит перед собой 3 конкретные, ясно сформулированные **задачи**:

1. Оценить влияние дефицита муцина2 на состав микрофлоры кишечника и иммунный статус мышей с нокаутом гена *Muc2* (*Muc2<sup>-/-</sup>*);
2. Определить роль бактериальной микрофлоры кишечника в изменении иммунного статуса мышей *Muc2<sup>-/-</sup>*;
3. Установить роль моносахарида L-фукозы в регуляции микрофлоры кишечника у мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* на фоне приема антибиотиков.

Все поставленные задачи успешно решены в процессе исследования.

Барьерная функция муцина2 имеет множество составляющих, из которых автор выбрал 3 на его взгляд наиболее принципиальные – иммунный статус

животного, состав его микробиоты и наличие фукозы в качестве компонента муцина, играющего заметную роль в поддержании иммунного статуса и состава микробиоты животного.

Обзор литературы состоит из 2-х основных разделов. Первый из них посвящен роли микробиоты в поддержании гомеостаза в кишечнике, а второй – воспалительному заболеванию кишечника. Каждый из разделов имеет ряд подразделов.

В целом обзор литературы полностью соответствует материалам диссертации, отличается доступностью изложения, охватывает все разделы собственной работы автора и логично подводит к Цели и задачам исследования.

В главе 2, содержащей описание объектов, методов исследования и используемых для проведения работ материалов, подробно описывается методическая часть всех экспериментов, а также методов их содержательной и статистической обработки.

Главы 3 и 4 (Результаты и Обсуждение результатов) тесно связаны, поэтому их содержание в данном Отзыве рассматривается совместно.

Изложение собственного материала исследований начинается *ab initio* с изучения иммунного статуса лабораторных мышей (*Muc2<sup>-/-</sup>*). В ходе большой и четко спланированной работы автором показано, что у мутантных мышей имеются признаки хронического воспаления: гиперплазия крипт, увеличенное количество лейкоцитов в ткани кишки, рост экспрессии генов провоспалительных цитокинов *Tnf* и *Il1b* и генов транскрипционных факторов Т-клеток *Rorc* (Th17) и *Foxp3* (регуляторные Т-клетки). Автор обоснованно полагает, что эти особенности могут быть следствием более тесных контактов клеток иммунной системы с микрофлорой и активацией иммунных механизмов, способствующих толерантности иммунной системы и поддержанию хронического воспаления в неактивной фазе. Кроме того, у мутантных мышей была повышена экспрессия фактора *Tff3*, продукта бокаловидных клеток эпителия. *Tff3* входит в состав мукусного барьера и способствует восстановлению эпителия. Была также исследована экспрессия генов *Nos2* и *Arg1* – ферментов макрофагов соответственно провоспалительного (M1) и противовоспалительного (M2) типов. Увеличенная экспрессия гена *Arg1* указывала на преимущественную поляризацию макрофагов по типу M2. Этот эффект автор объясняет необходимостью ускоренного восстановления ткани, поврежденной вследствие её тесного контакта с бактериями. Поскольку макрофаги M2 типа могут играть важную роль в процессе опухолеобразования, автор полагает, что описанное в литературе у мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* формирование опухолей может быть следствием активации M2 макрофагов и хронического воспаления в кишечнике. Помимо этого, у *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей была повышена экспрессии гена *Ptgs2*, кодирующего фермент циклооксигеназа2. Этот фермент нарабатывается макрофагами, участвует в синтезе медиаторов воспаления и, возможно, играет определенную роль в опухолеобразовании. В присутствии инфекции у мутантных животных был

активирован специфический иммунитет. Отмечалось увеличение количества IgG в толстой кишке, а также повышенное содержание в крови IgG против собственной микрофлоры. Все эти изменения сопровождались различиями в составе микробиоты мутантных и немутантных мышей.

Таким образом сравнение *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей и C57BL/6 выявило ряд особенностей иммунного статуса мутантных животных.

Значительный интерес вызывает группа экспериментов, в которых изучалась реакция мышей на обеднение их микробиоты. Для этого животных носителей *Helicobacter* sp. в течение двух недель поили антибиотиками широкого спектра действия (смесь кларитромицина, амоксициллина и метронидазола). Поскольку отсутствие муцина2 у экспериментальных мышей приводило к дефициту связанной с белком фукозы (что было подтверждено автором экспериментально), одновременно были поставлены эксперименты с добавлением фукозы в пищу животным с обедненной микробиотой. К концу эксперимента мутантные мыши значительно теряли в весе, а около 37% – погибали. Контрольные мыши (C57BL/6) полностью выживали, поначалу худели, но к концу эксперимента восстанавливались в весе. На фоне обеднения микрофлоры весьма показательно проявилось терапевтическое действие L-фукозы: её добавление в пищу приводило к 100% выживанию мутантных мышей и способствовало восстановлению их веса. После приема антибиотиков у животных практически не выявлялся *Helicobacter* sp. и, как и следовало ожидать, наблюдалось общее обеднение микробиоты. В ходе исследования причин гибели получавших антибиотики мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> в их кишечнике были обнаружены простейшие *Tritrichomonas* sp.. Освобожденные (не инфицированные) от протозойной инфекцией мутантные мыши от приёма антибиотиков не погибали. Обеднение бактериальной микрофлоры в сочетании с подавлением инфекции *Tritrichomonas* sp. (использовалась иная схема приема антибиотиков) также не приводило к истощению и гибели *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей. При этом немутантные мыши оказались защищены от колонизации кишечника *Tritrichomonas* sp. Таким образом было установлено, что муцин2 защищает мышей от колонизации кишечника *Tritrichomonas* sp., а фукоза предотвращает токсическое действие простейших в случае отсутствия муцина2. Механизм защитного действия муцина объясняется тем, что *Tritrichomonas* sp. прикрепляются к эпителиальным клеткам хозяина, а муцин этому препятствует. Воздействие *Tritrichomonas* sp. на клетки приводит к их гибели и, как следствие, к нарушению барьерной функции кишечника. В присутствии *Tritrichomonas* sp у мутантных мышей наблюдался рост концентрации в крови внутриклеточных ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ), что подтверждало цитотоксическое действие простейшего. Количество лактата в крови, который считается одним из маркеров сепсиса, при этом не изменялось.

Подавление микрофлоры антибиотиками независимо от присутствия инфекций приводило к снижению клеточности тимуса и селезенки, уменьшению

общего количества лейкоцитов, а также различных субпопуляций лимфоцитов в крови у мышей *Muc2<sup>-/-</sup>*. Отмечалось увеличение процента Т-клеток в селезенке (CD3<sup>+</sup>) и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в селезенке и крови. Таким образом, при нарушении микробиоты антибиотиками наблюдалось угнетение иммунной системы, затрагивающее различные органы, что согласовалось с данными литературы и подтверждало важную роль микробиоты в функционировании иммунной системы.

Для того чтобы оценить изменения состава бактериальной микрофлоры у *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей с инфекциями и без инфекций был проведен метагеномный анализ методом секвенирования ампликонов гена 16S rRNA (n=4 для каждой группы). Это исследование показало, что исходные альфа- и бета-разнообразие микрофлоры в группах инфицированных и неинфицированных мутантных мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей были одинаковые. Прием антибиотиков приводил к уменьшению альфа- и бета-разнообразия у *Muc2<sup>-/-</sup>* без инфекций при сохранении филогенетического разнообразия. У мышей с инфекциями альфа-разнообразие не изменялось, а бета-разнообразие и филогенетическое разнообразие при этом даже увеличивались. Таким образом наличие инфекции способствовало поддержанию более высокого альфа- и бета-разнообразия и увеличению филогенетического разнообразия при приеме животными антибиотиков.

В исходной микробиоте мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* (как с инфекцией, так и без инфекции) преобладал тип *Bacteroidetes* (до 75%). В значимых количествах присутствовали типы *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*. Под действием антибиотиков у неинфицированных мышей наблюдались значительные изменения, в результате которых уже около 85% составляли *Proteobacteria*. У животных с инфекцией изменения были менее драматичными: представленность *Bacteroidetes*, хотя и сокращалась, но все же оставалась на высоком уровне, при этом отмечался рост вклада *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*. Интересно, что при одновременном приеме антибиотиков и фукозы изменения микробиоты в группе инфицированных животных приобретали сходство с изменениями в группе неинфицированных животных.

Полученные результаты говорят о том, что антибиотики оказывали разнонаправленное действие на микробиоту мышей с инфекциями и без: у мышей без инфекций она становилась менее разнообразной, а у мышей с инфекциями, наоборот, более разнообразной.

Последний подраздел (4.7) основного раздела диссертации посвящен оценке прикладной значимости полученных результатов. В этом подразделе, в частности, отмечается, что полученные данные подтверждают необходимость с особой осторожностью относиться к антибактериальной терапии при ВЗК, заменяя, по возможности, эту терапию другими способами лечения.

Работа завершается разделами «Заключение» и «Выводы». Выводы носят конкретный характер, опираются на анализ данных и соответствуют результатам. Разделы «Список используемых сокращений» и «Список литературы» оформлены в соответствии с имеющимися требованиями к диссертационным работам. В

раздел «Приложения», включен дополнительный иллюстративный материал, не вошедший в основной текст.

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

### Замечания

Оценивая работу в целом, следует отметить, что она хорошо оформлена и иллюстрирована, написана хорошим языком, читается легко и с большим интересом. Количество опечаток настолько невелико, что не имеет смысла о них даже упоминать. Значительно облегчает восприятие материала используемая автором необычная форма заголовков низшего уровня в главе «Результаты». По существу эти заголовки представляют собой выводы из приведенных в соответствующем подразделе материалов, что повышает уровень восприятия текста и позволяет быстро в нем ориентироваться. Хочется также отметить добротные исчерпывающие подписи к рисункам, позволяющие воспринимать материал, не обращаясь за пояснениями к тексту раздела.

Принципиальных замечаний к диссертации и автореферату не имеется.

К недостаткам можно отнести наличие некоторых научных жаргонизмов и англоязычных заимствований в употреблении слов и выражений, однако все они, как правило, органично вписываются в общий текст. Недостатком можно считать и то, что из 255 наименований в списке литературы имеется только одна работа на русском языке, однако это скорее вина не автора, а следствие современных требований, предъявляемых к публикациям. Наука в современном мире прогрессирует очень быстро. По этой причине среди приведенных публикаций хотелось бы видеть больше работ последних лет. В списке диссертанта имеются только 2 работы за 2021 год, да и они являются собственными работами диссертанта с соавторами. За 2020 год – 5 работ, из них 2 работы диссертанта с соавторами, за 2019 – 11 работ.

Приведенные непринципиальные замечания не снижают ценности работы и не влияют на теоретические и практические результаты диссертации.

### Вопросы

1. Автор обнаружил, что прием антибиотиков инфицированными мышами *Misc2<sup>-/-</sup>* приводил к увеличению филогенетического разнообразия их микробиоты. В связи с этим возникает вопрос: за счет чего происходило это увеличение? Если за счет интродукции новых видов из окружающей среды, то будет ли результат иным (то есть филогенетическое разнообразие не увеличится), если мышей в аналогичном эксперименте содержать в стерильных условиях?

2. В диссертационной работе продемонстрирован ряд аспектов взаимодействия хозяина с микробиотой, но в действительности эти взаимоотношения могут быть намного сложнее. Известно, например, что *Helicobacter* секретируют антибактериальные пептиды, препятствующие развитию других кишечных инфекций. Симбиоты-простейшие травоядных животных и



термитов содержат в качестве эндоцитобионтов бактерии порядка *Bacteroidales*, переваривающие целлюлозу и фиксирующие атмосферный азот. Принимая это во внимание, можно ожидать, что элиминация *Helicobacter* и *Tritrichomonas* sp. может иметь не только позитивные последствия. Хотелось бы узнать мнение автора на эту тему.

3. В диссертации показано позитивное влияние фукозы на ряд показателей, в том числе и на выживаемость животных. Проводилось ли сравнительное изучение фукозы с другими моно- или олигосахаридами, используемыми также в лечебных или профилактических целях? Какие преимущества видит автор у фукозы по сравнению ними? Не может ли помешать практическому использованию фукозы её влияние на протекание беременности?

### Заключение

Диссертационная работа Ачасовой Ксении Михайловны «Роль гликопротеина муцина<sup>2</sup> 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 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539) предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Официальный оппонент, гражданин РФ доктор биологических наук (03.01.06), Главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»)

Вахитов Тимур Яшерович

Адрес: 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12

Телефон: +7 (812) 234-68-68

E-mail: tim-vakhitov@yandex.ru; vakhitov.ty@iemspb.ru

«05» мая 2022 г.

Подпись Вахитова Тимура Яшеровича заверяю:

Подпись Вахитова  
Удостоверяется  
Нач. отдела кадров ФГБНУ «ИЭМ»



Шабарова СВ