УТВЕРЖДАЮ
ВРИО директора Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова
Российской академии наук
доктор биологических наук

_____ Н.А. Дюжикова

«25» мая 2022 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук на диссертацию Шайдуллова Ильнара Фидаиковича «Механизмы влияния короткоцепочечных жирных кислот на сократительную активность толстой кишки мыши», представленную к защите в диссертационный совет Д 220.034.02 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Актуальность исследования

В последнее десятилетие накоплен значительный фактический материал, который демонстрирует существенную роль микробиоты желудочно-кишечного тракта в регуляции его пищеварительной, всасывательной и моторной функций, а также в поддержании кишечного иммунитета. Как свидетельствуют недавние исследования, нарушения нормального состава кишечной микрофлоры и продуцируемых ею метаболитов являются одном из факторов патогенеза многих гастроэнтерологических заболеваний и, в частности, таких распространенных и проблемных для терапии патологий как воспалительные заболевания кишечника и синдром раздраженной кишки. Короткоцепочечные жирные кислоты являются низкомолекулярными продуктами жизнедеятельности кишечных бактерий, нормальный метаболизм которых рассматривают как одно из условий сохранения иммунного ответа, проницаемости и моторики кишки, а их дисбаланс относят к причине формирования и обострения ряда заболеваний желудочно-кишечного тракта, в основе которых лежит его моторная дисфункция. В частности, изменения в продукции короткоцепочечных жирных кислот продемонстрировано у пациентов с синдромом раздраженной кишки - функциональном заболевании, ведущим симптомом которого является нарушение моторно-эвакуаторной функции

кишечной стенки в отсутствие её органической патологии. Между тем конкретные механизмы реализации влияний короткоцепочечных жирных кислот на сократительную активность толстой кишки в норме, а также особенности осуществления этих процессов при гастроэнтерологической патологии остаются недостаточно изученными, что существенным образом сдерживает разработку эффективных методов нормализации моторной функции желудочного-кишечного тракта при его хронических заболеваниях.

На основании указанного выше, диссертационное исследование И.Ф. Шайдуллова, посвященное выяснению механизмов, обеспечивающих влияние короткоцепочечных жирных кислот на сократительную активность толстой кишки мыши, и изучению особенностей их реализации при моделировании поствоспалительного синдрома раздраженной кишки, является актуальным как с научной, так и практической точек зрения.

Научная новизна исследования

В результате выполнения диссертационного исследования автором получены принципиально новые данные. Продемонстрировано, что короткоцепочечные жирные кислоты (уксусная, пропионовая, бутановая) оказывают дозозависимый угнетающий эффект на спонтанные и вызванные активацией Н-холинорецепторов сокращения продольных мышц проксимального отдела толстой кишки мыши. Установлено, что тормозные эффекты бутирата натрия на тонус и амплитуду спонтанных сокращений кишки реализуются через активацию Ca^{2+}-активируемых K^+-каналов большой проводимости, локализованных на гладкомышечных клетках, тогда как вызываемое бутиратом угнетение опосредуемых Н-холинорецепторами вызванных кишечных сокращений – через активацию Ca^{2+}-активируемых K+-каналов энтеральных нейронов. Подтверждена способность ацетата, пропионата и бутирата оказывать непосредственное активирующее действие на Ca^{2+}-активируемые K^+-каналы большой проводимости в культуре экспрессирующих их клеток. Показано, что у мышей с поствоспалительной кишечной гиперчувствительностью, сопровождающейся ускорением кишечного транзита, повышается общее фекальное содержание уксусной, пропионовой и бутановой кислот с увеличением относительной доли двух последних. Впервые установлено, что в этих условиях снижается эффективность ингибирующего действия ацетата и бутирата на спонтанную сократительную активность продольных мышц толстой кишки и не проявляются тормозные эффекты всех изученных короткоцепочечных жирных кислот на опосредуемые Н-холинорецепторами вызванные мышечные сокращения. Полученные автором новые данные свидетельствуют об ассоциированных с поствоспалительной кишечной дисфункцией перестройках в

молекулярных механизмах регуляции сократимости гладких мышц толстой кишки короткоцепочечными жирными кислотами.

Достоверность результатов исследования, степень обоснованности научных положений и выводов диссертации

Достоверность представленных результатов не вызывает сомнений, поскольку она обеспечена современным научным и методологическим уровнем работы, применением адекватных поставленным задачам и общепринятых для мирового уровня исследований в данной области методических подходов, сертифицированного оборудования и реактивов, а также достаточной репрезентативностью исследуемых выборок, значительным количеством полученного фактического материала и квалифицированной его обработкой.

Положения, выносимые на защиту, в достаточной мере аргументированы и подкреплены конкретными результатами, полученными при реализации исследования. Выводы соответствуют поставленным в диссертации задачам, обоснованно вытекают из экспериментальных данных, полученных при реализации отдельных этапов работы, и согласуются с положениями, выносимыми на защиту.

Критерием надежности результатов и обоснованности выводов работы могут служить их публикация в ведущих рецензируемых научных журналах, включая высокорейтинговые международные издания, а также их неоднократная апробация на всероссийских и международных научных форумах. Основные результаты диссертационной работы отражены в 14 печатных работах, включающих 3 статьи в изданиях, включенных в перечень ВАК, и 11 публикаций в материалах научных конференций и конгрессов.

Практическая и теоретическая значимость работы

Полученные в ходе выполненного исследования результаты могут быть использованы соответствующими специалистами в их научно-исследовательской деятельности и быть полезными для клинической практики. Теоретическое значение работы состоит в расширении знаний о механизмах регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток толстой кишки метаболитами бактериальной микрофлоры, в частности, короткоцепочечными жирными кислотами. Данные исследования, свидетельствующие о перестройках в этих процессах в условиях экспериментальной модели поствоспалительного синдрома раздраженной кишки, способствуют более глубокому пониманию механизмов развития моторной дисфункции пищеварительного тракта при данной патологии. В практическом аспекте полученные результаты открывают новые перспективы для разработки терапевтических методов нормализации моторной функции желудочного-

кишечного тракта при его функциональных заболеваниях. Материалы исследования могут быть использованы в курсах преподавания физиологии пищеварительной системы, физиологии висцеральных систем, гастроэнтерологии.

Объем и структура работы

Диссертационная работа построена по традиционному плану и содержит все необходимые разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты исследований, заключение, практические предложения и список использованной литературы. Работа изложена на 124 страницах машинописного текста, иллюстрирована 30 рисунками и 6 таблицами. Список литературы включает 259 источников (11 отечественных и 248 зарубежных).

Общая характеристика содержания работы

Во ***введении*** автор убедительно обосновывает актуальность изучаемой темы, четко формулирует цель исследования и необходимые для её достижения задачи, характеризует научную новизну и научно-практическую значимость полученных результатов, формулирует основные положения, выносимые на защиту. Раздел также содержит необходимую информацию об апробации работы и личном вкладе в неё автора.

Обзор литературы соответствует теме диссертации, отражает современный уровень знаний в исследуемой области, содержит ключевые сведения о малоизученных аспектах рассматриваемых вопросов, необходимые для обоснования поставленных в работе цели и задач. Анализируя внушительное количество отечественных и зарубежных исследований разных лет, включая опубликованные в последние 3 года, автор подробно характеризует текущие представления о процессах биосинтеза, функциях и мишенях действия короткоцепочечных жирных кислот в пищеварительном тракте, о нейрональных и ионных механизмах регуляции кишечной моторики, об основных медиаторах и ионных каналах, участвующих в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток толстой кишки. Суммированы имеющиеся в литературе сведения о нарушениях моторной функции нижних отелов пищеварительного тракта при синдроме разраженной кишки и их взаимосвязь с изменениями метаболизма короткоцепочечных жирных кислот кишечной микробиотой. В целом, литературный обзор отражает хорошую ориентированность автора в сфере его научных интересов и дает читателю хорошее представление о современном состоянии решаемой в диссертации проблемы.

Содержание главы «***Материалы и методы***» свидетельствует, что использованные в диссертации методы и подходы полностью соответствуют

современным требованиям к исследованиям в данной области. Следует отметить сложный комплексный подход к решению поставленных в работе задач, основанный на применении таких трудоемких методов как метод тензометрии для регистрации сократительной активности сегментов толстой кишки мыши, метод патч-кламп для регистрации активности Ca^{2+}-активируемых K+-каналов большой проводимости в культуре клеток, фармакологический метод для модуляции различных мембранных рецепторов и каналов, биохимическое определение уровня короткоцепочечных жирных кислот в фекалиях, гистологический анализ проксимального отдела толстой кишки в разных экспериментальных группах, метод оценки кишечной гиперчувствительности у бодрствующих мышей, а также метод оценки скорости внутрикишечного транзита *in vitro*. Такой подход требовал от исследователя уверенного владения всеми указанными техниками и определил качественно новый уровень полученных результатов, новизна и надежность которых не вызывают сомнений.

Глава «***Результаты исследования***» структурирована в соответствии с поставленными в работе задачами и дизайном исследования, отличается последовательным и логичным изложением экспериментального материала, полученного на разных этапах исследования с помощью разных методических подходов. Все данные подробно иллюстрированы легко читаемыми графиками, рисунками и микрофотографиями хорошего качества, а также информативными таблицами с числовыми данными. В конце каждого параграфа подводятся предварительные итоги и сформулированы предварительные выводы, что существенно облегчает восприятие и обобщение представленного материала. Содержание раздела свидетельствует, что все поставленные в работе задачи решены.

В главе «***Заключение***» автор подводи итоги и анализирует результаты собственных исследований и проводит их обсуждение с привлечением классических и современных точек зрения, имеющихся в литературных источниках, а также четко и последовательно формулирует ***выводы***, основанные на изложенных в работе экспериментальных результатах. Диссертация завершается ***практическими предложениями*** по использованию результатов работы и списком цитируемой литературы.

Оформление диссертации соответствует требованиям ГОСТ и в целом производит хорошее впечатление. Работа написана научным, понятным, лаконичным языком, читается с интересом, ее части логично связаны между собой. Все заимствованные сведения сопровождаются корректными ссылками на источники.

Автореферат диссертации соответствует требованиям ВАК РФ, изложен на 23 страницах, полностью соответствует содержанию работы, корректно отражает ее основные результаты, положения и выводы. Встречающиеся в текстах диссертации и автореферата опечатки и неудачные выражения не портят в целом ***положительную оценку*** работы.

Замечания и вопросы по диссертации

Наряду с отмеченными достоинствами диссертации, следует указать на имеющиеся в ней недостатки. Кроме того, при ознакомлении с работой возникло несколько вопросов.

Замечания:

1. В главе «Материалы и методы» отсутствует необходимая информация о происхождении и функциональных свойствах линии клеток GH3, использованной в экспериментах с патч-клампом.
2. Недостаточно полно охарактеризован и обоснован метод индукции поствоспалительной модели синдрома раздраженной кишки (СРК) с помощью раствора уксусной кислоты с точки зрения его адекватности для инициации данной патологии, продуктивности и клинической релевантности.
3. Ссылки в тексте диссертации на рис. 3,4,9 даны после представления этих рисунков, что затрудняет чтение.
4. На рис. 22 (стр. 71) в подписи под фрагментом (а) обозначена механограмма сократительной активности кишки, но на рисунке она отсутствует.
5. На рис. 23 (стр. 72) представлены только амплитуды вызванных агонистами холинорецепторов сокращений препарата кишки в условиях моделирования СРК, тогда как при ссылке на этот рисунок в тексте речь идет о сравнении этого показателя с таковым в контрольной группе, что следовало бы отразить на рисунке.
6. В разделе «Заключение» не обозначены вопросы и перспективы для дальнейших исследований в данной области, которые открывают полученные в работе данные.

Вопросы:

1. Насколько, по Вашему мнению, действие короткоцепочечных жирных кислот на Ca^{2+}-активируемые K^{+}-каналы линии клеток GH3 – линии нейросекреторных клеток, происходящих из переднего гипофиза, может быть сопоставимо с их действием на такие же каналы нервных и/или гладкомышечных клеток в кишке?
2. Использованная в работе модель позиционируется как методика СРК с диареей. Наблюдали ли Вы признаки диареи у мышей в данной экспериментальной группе?

Отличались ли они по весу тела от животных того же возраста в контрольной группе?

3. Какой процент мышей после неонатального введения раствора уксусной кислоты демонстрировали кишечную гиперчувствительность в Ваших исследованиях? У всех ли из них было отмечено усиление сократительной активности кишки или были случаи её уменьшения? Какой был процент летальных исходов после воздействия уксусной кислотой?

4. Не могли ли обнаруженные Вами изменения в относительном уровне продукции уксусной кислоты у мышей после инициации поствоспалительного СРК быть результатом компенсаторной реакции на введение экзогенной уксусной кислоты в неонатальный период?

5. Насколько существенным по Вашему мнению является выявленное в работе изменение в соотношении ацетата, пропионата и бутирата в фекалиях у мышей из группы СРК по сравнению с контролем? Проверялась ли значимость такого изменения статистическими методами?

Высказанные замечания и вопросы не являются принципиальными и не снижают научную и практическую значимость диссертации.

Заключение

Диссертация Шайдуллова Ильнара Фидаиковича на тему «Механизмы влияния короткоцепочечных жирных кислот на сократительную активность толстой кишки мыши» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на актуальную тему, самостоятельно, на современном научном и методическом уровнях. Диссертация написана единолично, обладает внутренним единством, свидетельствует о высокой профессиональной подготовленности автора. Работа соответствует паспорту научной специальности 03.03.01 – физиология и содержит новые научные результаты и положения, совокупность которых может быть квалифицирована как решение актуальной для физиологии задачи – выяснение вклада продуктов метаболической активности эндогенной микробиоты в нормальную регуляцию функций желудочно-кишечного тракта и их нарушение при патологии.

По актуальности темы, научному и методическому уровням, новизне и научно-практической значимости полученных результатов, обоснованности научных положений и выводов диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением

Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, с изменениями от 01.10.2018 г. № 1168, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Шайдуллов Ильнар Фидаикович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Отзыв подготовлен заведующей лабораторией кортико-висцеральной физиологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, доктором биологических наук Любашиной Ольгой Анатольевной, обсужден и утвержден на заседании отдела физиологии висцеральных систем Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 3-22 от «25» мая 2022 г).

Заведующий лабораторией кортико-висцеральной физиологии
ФГБУН Институт физиологии им. И.П.Павлова
Российской академии наук
доктор биологических наук Любашина Ольга Анатольевна

Тел.: +7 (813) 70 72-501
E-mail: lyubashinaoa@infran.ru

Подпись д.б.н. О.А. Любашиной заверяю

Подпись руки Любашиной О.А. удостоверяю
ст. инспектор
«25» 05 2022 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии имени И.П. Павлова Российской академии наук (ИФ РАН)
199034, г. Санкт-Петербург, Васильевский Остров, наб. Макарова, д. 6
Тел.: +7 (812) 328-07-01, +7 (812) 328-13-01
E-mail: Pavlov.institute@infran.ru
Сайт: https://www.infran.ru