

УТВЕРЖДАЮ
Ректор федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Рязанский государственный
медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
доктор медицинских наук, профессор
Р.Е. Калинин
«20» *сентября* 2026 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Диссертация «Механизмы регуляции проницаемости монослоя клеток назального эпителия RPMI 2650 при моделировании воспаления фактором некроза опухоли- α » выполнена на кафедре биологической химии.

В период подготовки диссертации соискатель Бреславец Дмитрий Игоревич являлся аспирантом кафедры биологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации с 2023 года по настоящее время.

В 2021 году окончил федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности «Лечебное дело»

Научный руководитель – Абаленихина Юлия Владимировна, доктор

медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биологической химии, профессор кафедры.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Оценка выполненной соискателем работы

Назальный эпителий выполняет важную барьерную функцию, защищая дыхательные пути от патогенов, аллергенов и других агентов окружающей среды. Целостность этого барьера обеспечивается сложной организацией межклеточных контактов, включающих плотные (tight junctions, TJ) и адгезивные (adherens junctions, AJ) соединения, ключевыми белками которых являются окклюдин, клаудин-1, ZO-1 и E-кадгерин соответственно. Нарушение барьерной функции выступает центральным звеном в патогенезе широкого спектра хронических воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей, таких как аллергический ринит и хронический риносинусит, распространенность которых неуклонно растет. Воспаление, характеризующееся высвобождением провоспалительных цитокинов, способно модулировать проницаемость эпителиального барьера. Фактор некроза опухоли-альфа (ФНО- α) является одним из ключевых медиаторов этого процесса, однако детальные механизмы его воздействия на специфические белки межклеточных контактов назального эпителия остаются недостаточно изученными и требуют дальнейшего исследования.

Современное изучение биохимических механизмов, лежащих в основе патофизиологии заболеваний верхних дыхательных путей, а также скрининг новых интраназальных лекарственных форм невозможны без использования корректных моделей *in vitro*. Первичные культуры клеток назального эпителия человека, несмотря на максимальное соответствие нативной ткани *in vivo*, обладают существенными ограничениями: межиндивидуальная вариабельность,

ограниченный жизненный цикл и сложность масштабирования экспериментальных исследований. В связи с этим, иммортализованная клеточная линия RPMI 2650, происходящая из карциномы носовой перегородки человека, представляет собой стандартизированную и удобную модель для изучения назального эпителия. Однако, несмотря на широкое использование этой линии для оценки назальной проницаемости, ее способность воспроизводить динамику воспалительного ответа и связанные с ним изменения барьерной функции изучена недостаточно. В частности, остается небольшим объем данных о корреляции между функциональными изменениями проницаемости монослоя под действием ФНО- α и количественными изменениями в экспрессии ключевых белков межклеточных контактов, а также миграционной активностью клеток RPMI 2650.

Таким образом, в настоящее время существует значительный пробел в понимании молекулярно-биохимических основ нарушения назального барьера, индуцированного ФНО- α , в клеточной модели RPMI 2650. В связи с этим, необходимо проведение комплексного исследования, направленного на выявление причинно-следственных связей между активацией внутриклеточных сигнальных путей, запускаемых ФНО- α , и изменениями структурно-функциональной организации эпителиального барьера. Полученные результаты позволят создать молекулярную модель дисфункции эпителиального барьера при ринопатологиях, что имеет фундаментальное значение для углубления знаний в области биохимии межклеточных взаимодействий и воспаления.

**Личное участие соискателя в получении результатов,
изложенных в диссертации**

Автор лично участвовал в планировании исследования, разработке дизайна экспериментальных моделей, самостоятельно выполнил аналитический обзор литературы по изучаемой проблеме. Автором проведены все этапы экспериментальной работы, включая культивирование клеток линии RPMI 2650, моделирование воспаления с использованием ФНО- α , оценка жизнеспособности

методом проточной цитометрии, вестерн-блот анализ, иммуноцитохимические исследования, скарификационный тест, а также анализ параклеточной проницаемости методом ВЭЖХ-МС/МС. Автором выполнена статистическая обработка, интерпретация полученных данных, сформулированы научные положения и выводы, а также подготовлены публикации по теме диссертации. Личный вклад автора в выполнение диссертационной работы составляет более 90%.

Объем и характер заимствованных фрагментов текста диссертации позволяют считать их законными цитатами.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием современных методов исследования с последующей систематизацией и статистической обработкой. Работа выполнена на клеточной линии назального эпителия человека RPMI 2650 (иммортилизованная клеточная линия) с применением современных высокотехнологичных биохимических методов: проточная цитометрия с красителем DAPI для оценки жизнеспособности клеток, вестерн-блот анализ для определения относительного количества ключевых белков (pro-IL1 β , Cleaved-Caspase 3, Bcl2, NF- κ B, ZO-1, E-кадгерин, клаудин-1, окклюдин, EGF), высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) для оценки параклеточной проницаемости маннитола, иммуноцитохимия для визуализации локализации белков межклеточных контактов, а также спектрофотометрические методы анализа для определения продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков. В работе проведена необходимая валидация методик: определение линейного диапазона детекции для вестерн-блот анализа и подтверждение стабильности экспрессии референсного белка GAPDH в условиях воздействия ФНО- α .

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием двух взаимодополняющих моделей культивирования (стандартный монослой и

поляризованный эпителиальный барьер в трансвелл-системах), проведением экспериментов в трех биологических повторностях (n=3) для каждой экспериментальной группы и временной точки. Статистическая обработка данных выполнена с использованием программного обеспечения GraphPad Prism с применением соответствующих методов параметрической статистики (однофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестами Даннетта и Тьюки, двусторонний t-критерий Стьюдента) при уровне значимости $p < 0,05$.

Достоверность первичных материалов подтверждена их экспертной оценкой. Положения, выносимые на защиту, и выводы аргументированы, логически следуют из полученных результатов и не противоречат имеющимся литературным данным. В исследовании использован достаточный объем.

Новизна результатов проведенных исследований

Научная новизна диссертационной работы определяется тем, что в ней впервые проведена комплексная характеристика ответа клеточной линии назального эпителия человека RPMI 2650 на провоспалительный стимул фактором некроза опухоли-альфа, включающая одновременную оценку жизнеспособности, барьерной функции и количественного содержания белков межклеточных контактов.

В работе впервые изучено влияние ФНО- α на миграционную активность клеток RPMI 2650 как аспект ремоделирования эпителиального барьера, при этом показано, что стимуляция миграции сопровождается повышением уровня эпидермального фактора роста (EGF), что указывает на активацию репаративных механизмов в условиях воспаления.

Важным результатом работы является, установление двухфазного характера влияния ФНО α на барьерную функцию монослоя: выявлена, ранее не описанная для данной модели компенсаторная фаза (6-24 часа), характеризующаяся усилением барьера (рост трансэпителиального электрического сопротивления и снижение проницаемости), и фаза декомпенсации (48 часов) с его нарушением. Кроме того, в работе впервые доказана прямая причинно-следственная связь между

функциональными изменениями проницаемости под действием ФНО- α и количественными изменениями ключевых белков межклеточных контактов (клаудин-1, окклюдин, E-кадгерин, ZO-1) для линии клеток RPMI 2650, что позволяет рассматривать данные белки в качестве молекулярных мишеней при коррекции барьерной дисфункции назального эпителия.

Практическая значимость результатов проведенных исследований

Полученные в диссертационной работе научные данные о молекулярных механизмах регуляции проницаемости назального эпителия в условиях воспаления расширяют существующие фундаментальные представления о роли белков межклеточных контактов в поддержании барьерной функции и их модуляции фактором некроза опухоли-альфа. Выявленный в работе двухфазный характер изменений барьерной функции под действием ФНО- α и установленная связь этих изменений с количественными сдвигами клаудина-1, окклюдина, E-кадгерина и ZO-1 могут быть использованы в качестве критериев оценки функционального состояния эпителиального барьера при скрининге потенциальных фармакологических соединений. Доказанное в работе участие белков плотных и адгезивных контактов в реализации как компенсаторной, так и декомпенсаторной фаз ответа на воспалительный стимул дополняет имеющиеся фундаментальные знания о механизмах ремоделирования межклеточных соединений при патологии. Выявленное стимулирующее действие ФНО- α в концентрации 10 нг/мл на миграционную активность клеток RPMI 2650, опосредованное повышением уровня эпидермального фактора роста (EGF), может рассматриваться как новый методический подход для изучения репаративных процессов в модели назального эпителия *in vitro*. Определение ключевой роли окислительного стресса и сигнального пути NF- κ B/IL-1 β в механизме ФНО- α -индуцированной дисфункции барьера позволяет рассматривать их в качестве потенциальных фармакологических мишеней для разработки стратегий, направленных на защиту и восстановление целостности назального эпителия при хронических ринологических заболеваниях.

Ценность научных работ соискателя

Полученные научные данные по механизмам регуляции проницаемости монослоя клеток назального эпителия RPMI 2650, в том числе посредством изменения количества белков межклеточных контактов (клаудина-1, окклюдина, E-кадгерина, ZO-1) под действием фактора некроза опухоли-альфа, могут быть использованы в качестве биохимической модели для оценки барьерной функции эпителия, в том числе при скрининге потенциальных фармакологических соединений, направленных на коррекцию нарушений проницаемости при хронических воспалительных заболеваниях верхних дыхательных путей. Доказанное в работе участие белков плотных и адгезивных контактов в реализации двухфазного ответа на провоспалительный стимул дополняет имеющиеся фундаментальные знания о молекулярных механизмах ремоделирования межклеточных соединений в условиях воспаления. Выявленное стимулирующее действие ФНО- α в концентрации 10 нг/мл на миграционную активность клеток RPMI 2650, сопровождающееся повышением уровня эпидермального фактора роста (EGF), является новым методическим подходом для изучения регенеративных процессов в модели назального эпителия *in vitro*. Определение ключевой роли сигнального пути NF- κ B/ $\text{I}\kappa\text{B}$ -1 β и окислительного стресса в механизме ФНО- α -индуцированной дисфункции барьера позволит рассматривать их в качестве потенциальных фармакологических мишеней для разработки стратегий, направленных на защиту и восстановление целостности эпителиального барьера в условиях воспаления.

Специальность, которой соответствует диссертация

Диссертационная работа посвящена изучению молекулярных механизмов регуляции проницаемости эпителиального барьера под действием провоспалительного цитокина, исследованию сигнальных путей (NF- κ B/ $\text{I}\kappa\text{B}$ -1 β , Bcl-2/Caspase-3), анализу количества ключевых белков межклеточных контактов (E-кадгерин, клаудины, окклюдин, ZO-1) и маркеров окислительного стресса. По

своему содержанию, цели и задачам работа соответствует паспорту специальности 1.5.4. Биохимия (медицинские науки), а именно пунктам: 2. «Биохимия белков. Протеомика. Белковая инженерия. Структурная биология», п 8. «Структура и метаболические функции биомембран», п. 15 «Программируемая клеточная гибель. Апоптоз, некроз, аутофагия».

**Полнота изложения материалов диссертации в работах,
опубликованных соискателем**

По материалам диссертации опубликовано 9 публикаций, из них 4 статьи в изданиях Перечня ВАК при Минобрнауки, из которых 2 – в изданиях, входящих в международную цитатно-аналитическую базу данных Scopus.

1. Двухфазное влияние фактора некроза опухоли- α на клетки линии RPMI 2650 *in vitro* / Ю.В. Абаленихина [и др.] – Текст : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2025. – Т.71, № 6. – С. 414-423. (соавт. Бреславец Д.И., Мыльников П.Ю., Буйлина С.Г., Щулькин А.В., Якушева Е.Н.).

2. Влияние фактора некроза опухоли альфа на проницаемость монослоя клеток назального эпителия / Ю.В. Абаленихина [и др.] – Текст : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2025. – Т.180, № 12. – С. 774-779. (соавт. Бреславец Д.И., Мыльников П.Ю., Буйлина С.Г., Щулькин А.В., Якушева Е.Н.).

3. Миграционная активность клеток линии RPMI 2650 в условиях индуцированного воспаления / Д.И. Бреславец [и др.] – Текст : непосредственный // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2025. – Т.28, № 4. – С. 94-100. (соавт. Абаленихина Ю.В., Стрельникова Е.А., Солотнова С.О., Буйлина С.Г., Сучкова О.Н.).

4. Относительное количество белков межклеточных контактов в динамике формирования монослоя клеток линии RPMI2650 / Д.И. Бреславец [и др.] – Текст : непосредственный // Технологии живых систем. – 2025. – Т.22, №2. – С. 58-65. (соавт. Абаленихина Ю.В., Щулькин А.В., Буйлина С.Г., Золотова А.В., Якушева

Е.Н.).

Диссертация «Механизмы регуляции проницаемости монослоя клеток назального эпителия RPMI 2650 при моделировании воспаления фактором некроза опухоли- α » Бреславец Дмитрия Игоревича рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Заключение принято на межкафедральном заседании кафедр: биологической химии; фармакологии; фармацевтической химии и фармакогнозии; инфекционных болезней и фтизиатрии; междисциплинарного научно-образовательного лабораторного центра ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Присутствовало на заседании профессорско-преподавательского состава 13 человек. Результаты голосования: «за» – 13 человек; «против» – нет; «воздержались» – нет (протокол №1 от 13 марта 2026 года).

Председатель межкафедрального совещания,
заведующий кафедрой фармакологии
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор

Якушева Елена Николаевна

Подпись профессора Якушевой Е.Н. заверяю:
проректор по научной работе и инновационному развитию
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
д.м.н., профессор

Сучков Игорь Александрович

