

УТВЕРЖДАЮ

Ректор

ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России
доктор медицинских наук, профессор
Лазаренко В.А.

« 16 » 04 2026 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической значимости диссертационной работы Бреславец Дмитрия Игоревича на тему «Механизмы регуляции проницаемости монослоя клеток назального эпителия RPMI 2650 при моделировании воспаления фактором некроза опухоли- α », представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы выполненной работы

Диссертационное исследование Бреславец Д.И. посвящено актуальной проблеме современной биохимии – изучению молекулярных механизмов нарушения барьерной функции назального эпителия при воспалении. Целостность эпителиального барьера является критическим фактором защиты организма от патогенов и аллергенов, а её нарушение лежит в основе патогенеза широко распространенных заболеваний, таких как аллергический ринит, хронический риносинусит и полипоз.

Особую актуальность исследованию придает тот факт, что, несмотря на большое количество работ, посвященных изучению роли провоспалительных цитокинов, механизмы их воздействия на специфические белки межклеточных контактов назального эпителия остаются недостаточно раскрытыми. Ключевой медиатор воспаления, фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), является центральным звеном патологического каскада, однако характер его влияния на барьерную функцию, в частности на модели клеток назального эпителия RPMI 2650, изучен фрагментарно. Имеющиеся в литературе данные противоречивы и не дают целостной картины о временной динамике и молекулярных основах изменения проницаемости.

Таким образом, работа, направленная на комплексный анализ двухфазного ответа назального эпителия на ФНО- α , выявление вклада белков межклеточных контактов и регенеративных механизмов в регуляцию барьерной функции, отвечает современным требованиям фундаментальной науки и имеет очевидную перспективу для практической медицины.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Научная новизна диссертационного исследования Бреславец Д.И. заключается в комплексном изучении молекулярно-биохимических механизмов регуляции барьерной функции назального эпителия в условиях воспаления, индуцированного фактором некроза опухоли- α , с использованием клеточной линии RPMI 2650. В ходе работы впервые проведена комплексная оценка ответа данной клеточной линии на провоспалительный стимул, включающая одновременный анализ жизнеспособности, барьерной функции, уровня и локализации ключевых белков межклеточных контактов, что позволило охарактеризовать способность этой модели воспроизводить сложную динамику воспалительного ответа *in vitro*.

Автором впервые изучено влияние фактора некроза опухоли- α на миграционную активность клеток RPMI 2650 как аспект моделирования эпителиального барьера. Показано, что стимуляция миграции на ранних этапах воздействия сопровождается повышением уровня эпидермального фактора роста, что указывает на активацию механизмов, направленных на восстановление целостности монослоя. Подобный регенеративный эффект цитокина ранее не был описан для данной модели.

Принципиально новым результатом является установленный двухфазный характер влияния фактора некроза опухоли- α на барьерную функцию монослоя клеток RPMI 2650, что вносит новый аспект в понимание регуляции функционирования назального эпителия при воспалении. Впервые для данной модели выявлена компенсаторная фаза, характеризующаяся уплотнением барьера, что проявляется ростом трансэпителиального электрического сопротивления и снижением параклеточной проницаемости, а также охарактеризована классическая фаза декомпенсации с нарушением барьерной функции.

Кроме того, впервые доказана прямая причинно-следственная связь между функциональными изменениями проницаемости монослоя под действием фактора некроза опухоли- α и количественными изменениями ключевых белков межклеточных контактов для линии клеток RPMI 2650.

Показано, что усиление барьера в компенсаторную фазу сопровождается повышением уровня всех изучаемых белков межклеточных контактов, включая как адгезивные, так и плотные соединения, тогда как его нарушение в фазу декомпенсации обусловлено селективным снижением уровня белков плотных контактов, являющихся ключевыми регуляторами парацеллюлярной проницаемости.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Диссертационное исследование вносит существенный вклад в развитие современных представлений о молекулярно-биохимических основах регуляции назального эпителия.

Теоретическая значимость работы заключается в углублении фундаментальных знаний о взаимодействии провоспалительных цитокинов с эпителиальными клетками слизистых оболочек. Полученные данные раскрывают стадийность воспалительного процесса и механизмы перехода от компенсаторного уплотнения барьера к его необратимому повреждению. Выявленная двухфазность ответа расширяет представления о сложной регуляции гомеостаза тканей в условиях хронического воспаления.

Практическая значимость исследования определяется его направленностью на решение прикладных задач. Оптимизированные условия длительного культивирования клеток RPMI 2650 (14–21 сутки) и разработанные методические подходы могут быть использованы в качестве стандартизированной *in vitro* модели для доклинических исследований токсичности, проницаемости и транспорта интраназальных лекарственных средств. Выявленные молекулярные мишени (белки плотных контактов) могут служить основой для разработки новых терапевтических стратегий, направленных не только на подавление воспаления, но и на восстановление барьерной функции эпителия при ринопатологиях.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проведен аналитический обзор литературы, разработан дизайн исследования, выполнены все эксперименты *in vitro*, включая культивирование клеток, вестерн-блот анализ, иммуноцитохимию, проточную цитометрию, скарификационный тест и оценку трансэпителиального сопротивления. Обработка, анализ и интерпретация полученных данных, а также подготовка научных публикаций осуществлялись автором при содействии научного руководителя.

Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедрах биологической химии и патофизиологии, а также в практическую работу Междисциплинарного научно-образовательного лабораторного центра ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Полученные данные целесообразно использовать при разработке методических пособий по биохимии, патофизиологии и фармакологии, а также в научных исследованиях, направленных на скрининг веществ, влияющих на эпителиальный барьер.

Полнота изложения результатов диссертации в научной печати

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, из которых 4 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, в том числе 2 публикации в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus. Подана 1 заявка на патент РФ на изобретение. Результаты исследования были представлены на 8 всероссийских и международных научных конференциях. Публикации в полной мере отражают основные положения диссертационной работы.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации полностью соответствует основным положениям и выводам, изложенным в диссертационной работе, и оформлен в соответствии с установленными требованиями. Диссертация соответствует пунктам 2, 8 и 15 паспорта научной специальности 1.5.4. Биохимия (медицинские науки).

Оценка содержания, оформления и завершенности диссертации в целом

Диссертационная работа Бреславец Дмитрия Игоревича представляет собой завершенное, логически выстроенное и тщательно оформленное научно-квалификационное исследование, полностью соответствующее требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Структура работы является классической и включает все необходимые разделы: введение, обзор литературы, главу с описанием материалов и методов исследования, главу с изложением результатов и их

обсуждением, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и список литературы. Такое построение обеспечивает последовательное и ясное восприятие материала, отражая все этапы проведения исследования – от постановки проблемы до интерпретации полученных данных.

Введение диссертации демонстрирует высокий уровень научной проработки исследуемой проблемы. Автором убедительно обоснована актуальность темы, связанная с необходимостью понимания молекулярно-биохимических механизмов нарушения барьерной функции назального эпителия при воспалительных заболеваниях, распространенность которых неуклонно растет. Проведен тщательный анализ степени разработанности темы, на основании чего сформулированы цель и задачи исследования, полностью соответствующие заявленной актуальности. Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы аргументированы и не вызывают сомнений. Положения, выносимые на защиту, сформулированы емко и отражают суть проведенного исследования.

Глава 1 (Обзор литературы) свидетельствует о глубокой и всесторонней проработке автором отечественных и зарубежных источников. В обзоре последовательно рассмотрены структурно-функциональные особенности назального эпителия *in vivo* и *in vitro*, подробно охарактеризованы молекулярные основы барьерной проницаемости с акцентом на ключевые белки межклеточных контактов (Е-кадгерин, клаудины, окклюдин, ZO-1), а также роль воспаления и фактора некроза опухоли- α в модуляции эпителиального барьера. Завершается глава обоснованным заключением, подводющим итог анализу литературы и определяющим место клеточной линии RPMI 2650 в качестве адекватной модели для проведения данного исследования.

Глава 2 (Материалы и методы исследования) отличается высокой степенью детализации и методологической проработанности. Автор подробно описывает объект исследования (клеточная линия RPMI 2650), условия культивирования, экспериментальные модели (стандартный и поляризованный монослой), дизайн исследования с указанием всех экспериментальных групп, концентраций и временных точек воздействия. Особого внимания заслуживает включение в методологический раздел процедур валидации – как для метода вестерн-блот (определение линейного диапазона детекции белков), так и для референсного белка GAPDH в условиях действия ФНО- α , что подтверждает корректность последующих количественных сравнений. Использованный спектр современных методов (проточная цитометрия, вестерн-блот, ВЭЖХ-МС/МС, иммуноцитохимия,

измерение трансэпителиального электрического сопротивления, скарификационный тест) является адекватным поставленным задачам, а их подробное описание позволяет воспроизвести эксперименты в любой профильной лаборатории.

Глава 3 (Результаты исследований и их обсуждение) представляет собой наиболее объемную и содержательную часть работы. Материал изложен логично и последовательно в соответствии с поставленными задачами. Вначале автор характеризует формирование монослоя клеток RPMI 2650, демонстрируя динамику накопления белков межклеточных контактов и роста трансэпителиального сопротивления, а также их корректную локализацию. Далее подробно представлены результаты моделирования воспаления: активация пути Nf-κB/ИЛ-1β, развитие окислительного стресса, изменения жизнеспособности и апоптотического статуса клеток, а также миграционная активность. Отдельно и детально рассмотрено влияние ФНО-α на барьерную функцию (динамика TEER и параклеточная проницаемость для маннитола) и на количество/локализацию белков межклеточных контактов. Важно отметить, что изложение результатов неразрывно сопровождается их обсуждением, что позволяет автору сразу интерпретировать полученные данные в контексте современной литературы, выявлять причинно-следственные связи и аргументировать двухфазный характер ответа.

Иллюстративный материал диссертации представлен 36 рисунками и 8 таблицами, которые дополняют текст, отличаются высоким качеством исполнения и наглядностью. Особо следует отметить изображения иммуноцитохимического анализа, демонстрирующие локализацию белков межклеточных контактов, а также графики, отражающие дозо- и времязависимые изменения изучаемых параметров. Таблицы систематизируют экспериментальные данные, облегчая их восприятие и сравнительный анализ.

Заключение диссертации представляет собой обобщение наиболее важных результатов исследования с акцентом на выявленную двухфазность ответа и ее молекулярные механизмы. Выводы в количестве пяти пунктов полностью соответствуют поставленным задачам, логически вытекают из содержания работы, четко сформулированы и аргументированы. Практические рекомендации адресованы специалистам в области биохимии, патофизиологии и экспериментальной фармакологии и имеют ценность для внедрения в научную и учебную практику.

Список литературы включает 266 источников, из которых 36 отечественных и 230 зарубежных, что свидетельствует о широкой эрудиции

автора и его способности работать с большим объемом научной информации. Литературные ссылки актуальны и релевантны теме исследования.

Завершенность работы. Диссертация представляет собой законченное научное исследование, в котором решена актуальная научная задача – выявлены молекулярно-биохимические механизмы регуляции проницаемости назального эпителия при воспалении. Полученные результаты не содержат противоречий и полностью раскрывают тему. Объем работы (158 страниц) является достаточным для полного изложения всех этапов исследования. Оформление диссертации соответствует установленным требованиям: текст структурирован, стиль изложения научный, терминология корректна. Встречающиеся в тексте единичные стилистические погрешности и технические опечатки не носят принципиального характера и не снижают высокую научно-практическую ценность работы.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

К несомненным достоинствам работы следует отнести комплексный методологический подход, использование современных высокоинформативных методов (проточная цитометрия, ВЭЖХ-МС/МС, вестерн-блот, иммуноцитохимия), а также тщательную валидацию условий эксперимента. Особого внимания заслуживает выявленный двухфазный эффект ФНО- α , который расширяет существующие представления о роли этого цитокина.

Принципиальных замечаний по структуре и содержанию работы нет.

В плане дискуссии хотелось бы получить ответы на следующие вопросы:

1. Поясните, чем обусловлен выбор концентрации ФНО- α 10 нг/мл как оптимальной для стимуляции миграционной активности, в то время как для большинства других изучаемых параметров (например, TEER, экспрессия белков контактов) эффекты носили дозозависимый характер?

2. В работе показано снижение уровня белков плотных контактов (клаудин-1 и окклюдин) в фазу декомпенсации (48 ч). Насколько, по Вашему мнению, это связано с общим снижением жизнеспособности клеток и активацией апоптоза, или же это является специфическим механизмом регуляции параклеточной проницаемости?

Заключение

Диссертация Бреславец Дмитрия Игоревича на тему «Механизмы регуляции проницаемости монослоя клеток назального эпителия RPMI 2650 при моделировании воспаления фактором некроза опухоли- α »,

представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи – выявления молекулярно-биохимических механизмов регуляции барьерной функции назального эпителия при воспалении, что имеет существенное значение для биохимии, патофизиологии и клинической оториноларингологии.

Диссертационная работа соответствует всем требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Бреславец Дмитрий Игоревич, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры биологии, медицинской генетики и экологии ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, протокол № 13 от 15.04.2026 г.

Заведующий кафедрой
биологии, медицинской генетики и экологии
ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России,
доктор биологических наук,
профессор

Владимир Анатольевич Королев

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 305041, г. Курск, ул. Карла Маркса, д. 3
Телефон: 8 (4712) 58-81-32
Эл. почта: rector@kurskmed.com
Сайт: <https://kurskmed.com>



*Подпись Королева В.А. заверено
зам. начальника управления
персоналом и кадровой работой*

Иван Калужский