

ОТЗЫВ

официального оппонента, заведующего кафедрой нормальной физиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации доктора медицинских наук, профессора Павлюченко Ивана Ивановича на диссертационную работу Бреславец Дмитрия Игоревича «Механизмы регуляции проницаемости монослоя клеток назального эпителия RPMI 2650 при моделировании воспаления фактором некроза опухоли- α », представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность исследования

Диссертационное исследование Бреславец Д.И. посвящено одной из наиболее актуальных проблем современной науки и в частности биохимии – изучению молекулярных механизмов дисфункции эпителиальных барьеров различной локализации при воспалении, в т.ч. и назального эпителия. Целостность назального эпителия, обеспечиваемая сложной организацией белковых молекул, являющихся основой межклеточных контактов (плотных и адгезивных), является одним из критических факторов поддержания гомеостаза дыхательных путей. Нарушение барьерной функции, связанной с повышенной параклеточной проницаемостью, рассматривается в качестве центрального патогенетического звена хронических воспалительных заболеваний носа, однако молекулярные механизмы и причины формирования этого процесса остаются недостаточно изученными. Особый интерес представляет тот факт, что по имеющимся данным одним из ключевых медиаторов воспалительной деструкции барьера выступает фактор некроза опухоли- α (ФНО- α) – плеiotропный провоспалительный цитокин, запускающий каскады внутриклеточной сигнализации, окислительного стресса и апоптоза. Однако, несмотря на многочисленные исследования, посвященные роли ФНО- α в патологии кишечного и бронхиального эпителия, пути его воздействия на специфические белки межклеточных контактов назального эпителия, а также сопряженность этих изменений с развитием как окислительного стресса, так и регенеративных процессов остаются недостаточно изученными. Особенно это касается стандартизированных *in vitro* моделей, таких как клеточная линия RPMI 2650, которая, широко применяется в фармакокинетических исследованиях, но практически не охарактеризована с точки зрения провоспалительного ответа.

Таким образом, работа Бреславец Д.И., направленная на комплексный анализ биохимических механизмов регуляции проницаемости монослоя RPMI 2650 при моделировании воспаления ФНО- α , является безусловно актуальной

и имеет как фундаментальное значение для понимания метаболических сдвигов и патогенеза ринопатологий, так и практическую ценность для разработки новых направлений в профилактике и лечении данной нозологии.

Научная новизна работы

Научная новизна диссертационной работы Бреславец Д.И. не вызывает сомнений и заключается в комплексном, системном подходе к изучению *in vitro* ответа клеток назального эпителия на провоспалительный стимул. Автором впервые охарактеризована клеточная линия RPMI 2650 как модель для воспроизведения ключевых биохимических каскадов воспалительного ответа, включая активацию сигнального пути Nf-κB, синтез провоспалительного цитокина ИЛ-1β, развитие окислительного стресса и изменение барьерной функции.

Принципиально новым результатом, имеющим фундаментальное значение для понимания патофизиологии воспаления, является установленный автором двухфазный характер влияния ФНО-α на барьерную функцию монослоя. Вопреки устоявшимся представлениям, кратковременное воздействие ФНО-α (6–24 ч) вызывает компенсаторное уплотнение барьера, тогда как пролонгированная экспозиция (48 ч) приводит к его декомпенсации. Пик окислительного стресса совпадает по времени с фазой декомпенсации и активацией апоптоза, что указывает на первостепенную роль окислительного повреждения в процессах перехода от адаптации к патологическому нарушению проницаемости.

Впервые для клеточной линии RPMI 2650 изучено влияние ФНО-α на миграционную активность: в оптимальной концентрации (10 нг/мл) цитокин стимулирует закрытие раневого дефекта (6–24 часа) на фоне повышения уровня EGF, что раскрывает регенеративный аспект действия ФНО-α. Кроме того, доказана прямая причинно-следственная связь между функциональными изменениями проницаемости и количественными изменениями белков межклеточных контактов: компенсаторное уплотнение барьера сопровождается повышением уровня как адгезивных (E-кадгерин), так и плотных (клаудин-1, окклюдин, ZO-1) контактов, тогда как фаза декомпенсации – селективным снижением именно белков плотных контактов (клаудина-1 и окклюдина), ответственных за параклеточный транспорт.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в диссертационной работе результаты имеют высокую теоретическую и практическую значимость, что обусловлено как фундаментальной новизной, так и прикладной направленностью

исследования.

Теоретическая значимость работы заключается в существенном расширении современных представлений о молекулярно-биохимических механизмах регуляции состояния назального эпителия при воспалении. Выявленная двухфазность ответа на воздействие ФНО- α вносит вклад в понимание стадийности воспалительного процесса: от мобилизации защитных ресурсов клетки (усиление экспрессии белков контактов, стимуляция миграции) до истощения адаптационных механизмов и развития необратимых нарушений.

Особую ценность представляют данные о роли окислительного стресса в дестабилизации белков плотных контактов. Показанная временная и дозовая зависимость накопления продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков, а также их корреляция со снижением уровня клаудина-1 и окклюдина, позволяют рассматривать редокс-зависимые механизмы в качестве ключевых мишеней для фармакологической коррекции барьерной дисфункции. Полученные результаты углубляют фундаментальные знания о взаимодействии провоспалительных цитокинов с эпителиальными клетками слизистых оболочек и закладывают биохимические основы для дальнейших исследований в области патобиохимии и патофизиологии верхних дыхательных путей.

Практическая значимость исследования определяется его непосредственной направленностью на решение прикладных задач доклинической медицины и фармакологии. Охарактеризованная *in vitro* модель на основе клеточной линии RPMI 2650, культивируемой в оптимизированных условиях (14–21 сутки, граница раздела воздух-жидкость), может быть рекомендована в качестве стандартизированной системы для широкого спектра исследований. Количественные параметры зрелого монослоя (уровни TEER, профиль экспрессии и локализация белков межклеточных контактов) могут служить референтными значениями для оценки качества и воспроизводимости экспериментов в различных лабораториях.

Данная модель пригодна для скрининга интраназальных лекарственных средств, оценки их проницаемости и токсичности, а также для изучения механизмов действия соединений, потенциально способных влиять на эпителиальный барьер. Выявленные молекулярные мишени – белки плотных контактов клаудин-1 и окклюдин – могут рассматриваться как перспективные биохимические мишени для разработки новых фармакологических стратегий, направленных на поддержание целостности и восстановление барьерной функции при хронических риносинуситах, аллергическом рините и полипозе.

Кроме того, полученные данные о стимуляции миграции и EGF-зависимых механизмах регенерации создают основу для поиска регуляторов этих процессов в эпителиальных тканях.

Анализ структуры диссертационной работы

Диссертационная работа Бреславец Д.И. построена по классическому принципу и имеет логически выверенную структуру, полностью соответствующую цели и задачам исследования. Работа изложена на 158 страницах машинописного текста и включает все необходимые разделы: введение, обзор литературы (глава 1), описание материалов и методов (глава 2), изложение результатов исследования с их обсуждением (глава 3), заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и список литературы.

Во введении автором убедительно обоснована актуальность темы, проведен тщательный анализ степени разработанности темы, что позволило выявить существующий пробел в понимании молекулярных механизмов действия ФНО- α на клеточную линию RPMI 2650. На основании этого 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 конкретно и отражают суть проведенного исследования. Следует отметить, что введение изложено доступным и хорошо воспринимаемым научным языком, демонстрирующим способность автора к критическому анализу и синтезу информации.

Глава 1 (Обзор литературы) свидетельствует о глубокой и всесторонней проработке автором значительного массива литературных источников (всего 266, из которых 230 – зарубежных). Обзор структурирован логично и последовательно. В первом подразделе рассмотрены структурно-функциональные особенности назального эпителия *in vivo* и *in vitro*, дан критический анализ существующих моделей с обоснованием выбора клеточной линии RPMI 2650. Во втором подразделе подробно охарактеризованы молекулярные основы барьерной проницаемости с акцентом на ключевые белки межклеточных контактов – E-кадгерин, клаудины, окклюдин и ZO-1. Автор не ограничивается простым перечислением, а детально разбирает структурные особенности, посттрансляционные модификации и функциональную роль каждого белка. Третий подраздел посвящен роли воспаления как модулятора эпителиального барьера, причем особое внимание уделяется ФНО- α – его рецепторам, сигнальным путям и молекулярным механизмам регуляции проницаемости.

Завершается глава обоснованным заключением, подводящим итог анализу литературы и определяющим место клеточной линии RPMI 2650 в качестве адекватной модели для проведения данного исследования. Обзор написан хорошим научным и литературным языком, критически осмыслен и создает прочный фундамент для последующих экспериментальных разделов.

Глава 2 (Материалы и методы исследования) заслуживает отдельной высокой оценки и отличается достаточной степенью детализации и методологической проработанности. Автор подробно описывает объект исследования, условия культивирования, две экспериментальные модели (стандартный и поляризованный монослой), дизайн исследования с указанием всех экспериментальных групп, концентраций ФНО- α и временных точек воздействия. Особого внимания заслуживает включение в методический раздел процедур валидации, что свидетельствует о высоком методологическом уровне работы и обеспечивает достоверность последующих количественных сравнений. Использованный спектр современных методов (проточная цитометрия с DAPI, вестерн-блот, ВЭЖХ-МС/МС, иммуоцитохимия, измерение трансэпителиального электрического сопротивления, скарификационный тест) является адекватным поставленным задачам. Каждый метод описан с подробной детализацией этапов. Статистическая обработка данных выполнена корректно с использованием адекватных параметрических методов (ANOVA, тесты Тьюки и Даннетта, t-критерий Стьюдента).

Глава 3 (Результаты исследований и их обсуждение) является центральной частью работы. Глава разбита на четыре крупных подраздела. В первом подразделе (3.1) автор характеризует формирование монослоя клеток RPMI 2650, демонстрируя динамику накопления белков межклеточных контактов (E-кадгерин, клаудин-1, окклюдин, ZO-1) и роста трансэпителиального сопротивления, а также их конкретную локализацию. Важно отметить, что автором убедительно показано достижение стабильного плато по всем параметрам к 14–21 суткам, что обосновывает выбор временных рамок для последующих экспериментов. Во втором подразделе (3.2) представлена оценка провоспалительного, цитотоксического, окислительного и регенеративного ответа клеток на воздействие ФНО- α . Автор последовательно демонстрирует активацию пути Nf- κ B/ИЛ-1 β , развитие дозо- и времязависимого окислительного стресса (накопление продуктов ПОЛ и карбонильных производных белков), изменения жизнеспособности и апоптотического статуса (Bcl-2, cleaved caspase-3), а также стимуляцию миграционной активности на фоне повышения уровня EGF. Особого внимания заслуживает двухфазная динамика апоптотических маркеров – первоначальное

повышение антиапоптотического фактора Bcl-2 и последующая активация cleaved caspase-3, что может свидетельствовать об истощении защитных ресурсов клетки при длительном воздействии цитокина. Третий подраздел (3.3) посвящен влиянию ФНО- α на барьерную функцию. Автором показана двухфазная динамика TEER и параклеточной проницаемости для маннитола: компенсаторное уплотнение барьера в ранние сроки (6–24 часа) сменяется выраженным нарушением при пролонгированной экспозиции (48 часов). Четвертый подраздел (3.4) раскрывает молекулярные механизмы этих изменений – разнонаправленную динамику уровня и локализации 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.

Заключение диссертации представляет собой обобщение наиболее важных результатов исследования с раскрытием молекулярных механизмов исследуемой проблемы. Автор кратко и лаконично резюмирует основные итоги, подчеркивая их теоретическое и практическое значение.

Сформулированные автором пять выводов в полной мере отражают поставленные задачи, логически следуют из представленных результатов, отличаются четкостью и убедительной аргументацией.

Практические рекомендации ориентированы на исследователей в сфере биохимии, патофизиологии и доклинической фармакологии и представляют несомненный интерес для использования как в научно-исследовательской, так и в педагогической деятельности.

Литературные ссылки актуальны, релевантны теме исследования и охватывают как классические работы, так и публикации последних лет.

Иллюстративный материал диссертации представлен 36 рисунками и 8 таблицами, которые дополняют текст, отличаются необходимым качеством исполнения и наглядностью. Особо следует отметить иммунофлуоресцентные изображения (рисунки 20, 34), наглядно демонстрирующие локализацию белков межклеточных контактов, а также графики, отражающие дозо- и времязависимые изменения изучаемых параметров. Таблицы систематизируют экспериментальные данные (например, динамику TEER и проницаемости маннитола), облегчая их восприятие и сравнительный анализ.

Таким образом, структура диссертационной работы является логичной, завершенной и полностью соответствует современным требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Содержание каждого раздела вносит вклад в достижение поставленной цели и решение сформулированных

задач.

Полнота освещения результатов в печати

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации научных результатов диссертационных исследований, из которых 2 публикации в изданиях, индексируемых в международной цитатноаналитической базе данных Scopus. Подана 1 заявка на патент РФ на изобретение. Материалы диссертационного исследования были многократно представлены на всероссийских и международных конференциях.

Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.4. Биохимия по пунктам: «Биохимия белков. Протеомика» (анализ количества белков методом вестрен-блот), «Структура и функции биомембран» (локализация и количество белков межклеточных контактов), «Программируемая клеточная гибель. Апоптоз, некроз, аутофагия» (оценка популяции жизнеспособных клеток методом проточной цитометрии, выявление уровня белков Bcl-2 и Cleaved-Caspase 3).

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Таким образом, диссертационная работа Бреславец Дмитрия Игоревича является значимым вкладом в медицинскую биохимию, а ее автор демонстрирует высокую квалификацию и потенциал для дальнейшей научной деятельности.

Замечания и вопросы

Принципиальных замечаний к стилю изложения и к оформлению диссертации нет.

К диссертанту имеются вопросы дискуссионного характера:

1. Можно ли интерпретировать селективное снижение белков плотных контактов как указание на то, что апоптоз вносит второстепенный вклад в снижение TEER, а главную роль играют посттрансляционные механизмы в живых клетках?
2. Вы оценивали содержание продуктов окислительного стресса, а не активность ферментов антиоксидантной защиты. Почему был выбран именно этот показатель, учитывая, что главную защиту клеток *in vivo* обеспечивает антиоксидантный потенциал крови?
3. Поясните, пожалуйста, почему пересчет продуктов перекисного окисления липидов был выполнен на мг белка?

Заключение

Диссертация Бреславец Дмитрия Игоревича «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, содержит решение научной задачи – раскрытие молекулярно-биохимических механизмов, контролирующих барьерную функцию назального эпителия при воспалительном процессе, вызванном фактором некроза опухоли- α . 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 ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

заведующий кафедрой нормальной физиологии
федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Кубанский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
доктор медицинских наук, профессор



Павлюченко Иван Иванович

Подпись профессора Павлюченко И.И. заверяю:

Ученый секретарь ученого совета
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России,
доктор философских наук,
профессор



Ковелина Татьяна Афанасьевна

27.04.2026

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации Адрес: 350063, Российская Федерация, Краснодарский край, г. Краснодар, ул. имени Митрофана Седина, 4
Телефон: +7(8611)268-36-84, E-mail: corpus@ksma.ru, Сайт: <https://www.ksma.ru>