

## ОТЗЫВ

официального оппонента

кандидата биологических наук Федоровой Арины Александровны  
на диссертационную работу Бреславец Дмитрия Игоревича  
«Механизмы регуляции проницаемости монослоя клеток назального эпителия  
RPMI 2650 при моделировании воспаления фактором некроза опухоли- $\alpha$ »,  
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских  
наук по специальности 1.5.4. Биохимия

### Актуальность темы исследования

Межклеточные контакты назального эпителия представляют собой динамическую функциональную систему, обеспечивающую не только механическое сцепление соседних клеток, но и избирательную проницаемость, а также участие в межклеточной сигнализации. Скоординированная работа адгезивных (Е-кадгерин) и плотных (клаудины, окклюдин, ZO-1) контактов поддерживает барьерную функцию, защищая нижележащие ткани от проникновения чужеродных агентов и одновременно регулируя транспорт ионов и малых молекул. Любое нарушение организации этих контактов неизбежно приводит к повышению проницаемости слизистой оболочки, что рассматривается как ключевое звено патогенеза хронических воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей – аллергического ринита, хронического риносинусита и полипоза.

Однако важно не только констатировать факт повреждения межклеточных контактов, но и понимать ответ эпителия на воспалительный стимул и биохимические аспекты данного нарушения. Центральную роль в регуляции этих процессов играет фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) – плеiotропный цитокин, который в физиологических условиях участвует в поддержании тканевого гомеостаза, а при хронической гиперпродукции становится мощным дестабилизирующим фактором. До настоящего времени оставалось неясным, как именно назальный эпителий, в частности его межклеточные контакты, реагирует на нарастающую воспалительную нагрузку: является ли нарушение барьера неизбежным и однонаправленным процессом или же клетки способны мобилизовать защитные механизмы, временно укрепляя контакты. Данный вопрос принципиально важен, так как его решение позволяет оценить адаптационный резерв эпителиальной ткани, выявить критический момент истощения защитных механизмов и, главное, определить конкретные биохимические пути, обеспечивающие поддержание барьера в неблагоприятных условиях. Диссертационная работа Бреславец Д.И., выполненная на стандартизированной *in vitro* модели – клеточной линии RPMI 2650, – направлена на изучение биохимических каскадов регуляции. Полученные результаты не только расширяют фундаментальные представления о физиологической регуляции межклеточных

контактов назального эпителия при воспалении, но и создают основу для разработки стратегий ранней терапевтической коррекции, направленных на поддержание компенсаторных реакций и предотвращение перехода к необратимому нарушению барьера.

### **Научная новизна и достоверность полученных результатов**

Научная новизна диссертационной работы Бреславец Д.И. определяется в первую очередь тем, что автором впервые проведено комплексное исследование динамики ключевых белков межклеточных контактов назального эпителия – E-кадгерина, клаудина-1, окклюдина и ZO-1 – в условиях моделирования воспаления фактором некроза опухоли- $\alpha$  на клеточной линии RPMI 2650. Ранее данная модель использовалась преимущественно для фармакокинетических исследований, тогда как ее способность воспроизводить специфические изменения белкового состава межклеточных соединений при воспалении оставалась практически не изученной.

Принципиально новым результатом является установленная автором разнонаправленная динамика белков межклеточных контактов в зависимости от длительности воздействия ФНО- $\alpha$ . Показано, что кратковременная экспозиция (6 часов) вызывает дозозависимое повышение уровня всех исследуемых белков – как адгезивного E-кадгерина, так и белков плотных контактов (клаудин-1, окклюдин, ZO-1), что сопровождается функциональным уплотнением барьера. Напротив, при пролонгированном воздействии (48 часов) выявлено селективное снижение уровня именно белков плотных контактов – клаудина-1 и окклюдина, тогда как количество E-кадгерина и ZO-1 оставалось на контрольном уровне. Такая дифференцированная чувствительность разных типов межклеточных контактов к длительному воспалительному стимулу ранее не была описана для назального эпителия и имеет ключевое значение для понимания молекулярных механизмов повышения параклеточной проницаемости.

Впервые показано, что изменения количества белков межклеточных контактов под действием ФНО- $\alpha$  не сопровождаются нарушением их локализации – окклюдин и клаудин-1 остаются в области апикальных мембран, E-кадгерин – по латеральным контактам, ZO-1 – в примембранной зоне. Это свидетельствует о том, что функциональные изменения барьера обусловлены именно количественными сдвигами белков, а не их перераспределением в клетке.

Кроме того, установлена прямая корреляция между окислительным стрессом и уровнем белков плотных контактов: пик накопления продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных (48 ч) совпадает со снижением клаудина-1 и окклюдина, что указывает на редокс-зависимые механизмы как один из ключевых факторов дестабилизации плотных контактов. Также впервые изучено

влияние ФНО- $\alpha$  на миграционную активность клеток RPMI 2650. Стимуляция миграции (10 нг/мл, 6–24 ч) сопровождается повышением уровня EGF, что раскрывает потенциальный механизм регенерации межклеточных соединений при воспалении.

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием современных биохимических методов (проточная цитометрия, вестерн-блоттинг с валидацией, ВЭЖХ-МС/МС, иммуноцитохимия), продуманным дизайном исследования.

### **Анализ структуры и содержания работы**

Диссертация построена по классическому принципу, изложена на 158 страницах. Во введении четко обоснована актуальность, сформулированы цель и задачи исследования, представлена научная новизна и практическая значимость. Положения, выносимые на защиту, логично отражают основные результаты работы.

Глава 1 (Обзор литературы) построена по принципу «от общего к частному»: от тканевой организации к клеточным моделям, от клеточных моделей к молекулярным компонентам барьера (белкам межклеточных контактов), и наконец, к регуляторным влияниям – роли воспаления и конкретно ФНО- $\alpha$ . Такая структура позволяет читателю не только получить необходимые сведения, но и понять логику выбора клеточной линии RPMI 2650 в качестве экспериментальной модели. Завершающее резюме главы не повторяет изложенное, а интегрирует разрозненные данные в единую концептуальную схему, которая обосновывает необходимость данного исследования.

Глава 2 (Материалы и методы) представляет собой методологическую основу, обеспечивающую достоверность всех последующих результатов. Автор детально обосновывает выбор концентраций ФНО- $\alpha$  (1–100 нг/мл) и временных точек (6, 24, 48 ч), позволяющих охватить как ранние сигнальные события, так и отсроченные эффекты. Принципиально важным является включение в эту главу результатов валидации ключевых методов – вестерн-блота (с определением линейного диапазона для каждого белка) и стабильности референсного белка GAPDH в условиях эксперимента. Эти процедуры, часто опускаемые в диссертационных работах, здесь представлены как неотъемлемая часть методологии, что существенно повышает доверие к количественным данным.

Глава 3 (Результаты и обсуждение) описана как последовательное развертывание доказательной базы в соответствии с задачами исследования. В главе сначала характеризуется модель, затем поэтапно раскрывается реакция

клеток на воспалительный стимул и, наконец, вскрываются молекулярные механизмы наблюдаемых эффектов.

Раздел 3.1 посвящен обоснованию того, что клеточная линия RPMI 2650 действительно может служить моделью назального барьера. Здесь автор показывает, как в процессе длительного культивирования (до 21 суток) нарастает содержание белков межклеточных контактов – E-кадгерина, клаудина-1, окклюдина и ZO-1, как они правильно располагаются в мембранах клеток и как синхронно с этим растет трансэпителиальное электрическое сопротивление. Ключевой вывод раздела – к 14–21 дню все показатели выходят на плато, что задает временные рамки для всех последующих экспериментов.

В разделе 3.2 автор переходит к главному – моделированию воспаления. Последовательно разбирается механизм воздействия ФНО- $\alpha$  на клетки: запускает сигнальный каскад Nf- $\kappa$ B (о чем судят по накоплению этого фактора в ядрах), стимулирует синтез предшественника ИЛ-1 $\beta$ , провоцирует окислительный стресс (оцениваемый по продуктам перекисного окисления липидов и окисленным белкам), влияет на выживаемость и апоптоз (через баланс Bcl-2 и активной каспазы-3). Неожиданным результатом, представленным в этом же разделе, оказалась стимуляция миграционной активности клеток под действием ФНО- $\alpha$  в концентрации 10 нг/мл, причем этот эффект сопровождается повышением уровня фактора роста EGF, что указывает на регенеративный потенциал цитокина.

Раздел 3.3 – ключевой с точки зрения функциональных изменений. Измеряя TEER и проницаемость для маннитола, автор обнаруживает двухфазный ответ: на ранних сроках (6–24 часа) барьер неожиданно укрепляется – сопротивление растет, а проницаемость падает; однако к 48 часам ситуация меняется на противоположную – сопротивление резко снижается, а транспорт маннитола через монослой возрастает в разы.

В разделе 3.4 автор объясняет полученные результаты. Кратковременное воздействие ФНО- $\alpha$  повышает уровень всех изучаемых белков межклеточных контактов – и адгезивных, и плотных. А вот длительное воздействие приводит к избирательному падению именно белков плотных контактов – клаудина-1 и окклюдина, тогда как E-кадгерин и ZO-1 остаются на прежнем уровне. При этом локализация белков в клетке не нарушается.

Все результаты сопровождаются иллюстративным материалом (36 рисунков, 8 таблиц), который не дублирует текст, а служит самостоятельным источником информации. Графики позволяют оценить динамику процессов, иммунофлуоресцентные изображения – визуализировать локализацию белков, таблицы – систематизировать числовые данные для сравнительного анализа.

Обсуждение вплетено в изложение результатов. Каждый новый факт автор тут же сопоставляет с тем, что известно из литературы, и поясняет фундаментальный вклад в существующие представления.

В заключении автор сводит полученные результаты в единую схему двухфазного ответа назального эпителия на воспаление, выделяя ключевое звено: переход от компенсаторного повышения белков контактов к их селективному снижению в условиях окислительного стресса и апоптоза.

Выводы соответствуют задачам исследования. Каждый вывод соотносится с одной из поставленных задач и содержит количественные или качественные характеристики полученного результата, что позволяет использовать их как самостоятельные научные факты.

Практические рекомендации ориентированы на исследователей, работающих с моделью RPMI 2650, и разработчиков интраназальных лекарственных препаратов.

### **Полнота освещения результатов диссертации в печати**

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, из них 4 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, что полностью отражает содержание работы. Подана 1 заявка на патент РФ на изобретение.

### **Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации**

Автореферат диссертации отражает полученные результаты, положения и выводы диссертации, написан в соответствии с требованиями ВАК при Минобрнауки России.

Завершая анализ диссертационной работы, считаю необходимым отметить её высокий уровень концептуальности, методический уровень и несомненную теоретическую и практическую значимость. Принципиальных замечаний при знакомстве с диссертационной работой не возникло.

### **Вопросы по диссертационной работе**

1. Является ли повышение уровня E-кадгерина первичным по отношению к увеличению количества клаудина-1 и окклюдина в компенсаторную фазу, или же эти процессы строго синхронны? Позволяют ли временные точки 6, 24 и 48 ч ответить на этот вопрос?

2. Чем объясняется устойчивость ZO-1 к длительному воспалительному воздействию в отличие от клаудина-1 и окклюдина – различной скоростью обновления белков или дополнительными функциями ZO-1, не связанными с поддержанием барьера?
3. Клеточная линия RPMI 2650 имеет опухолевое происхождение. В какой степени выявленные механизмы отражают физиологические процессы *in vivo*?
4. Можно ли считать выявленный двухфазный ответ универсальным для эпителиальных барьеров или он специфичен для модели RPMI 2650?

### Заключение

Диссертационная работа Бреславец Дмитрия Игоревича «Механизмы регуляции проницаемости монослоя клеток назального эпителия RPMI 2650 при моделировании воспаления фактором некроза опухоли- $\alpha$ » является завершённой научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной задачи современной биохимии – выявление механизмов, лежащих в основе дисфункции эпителиального барьера верхних дыхательных путей при воспалении.

По своей актуальности, научной новизне, объёму выполненных исследований, теоретической и практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Бреславец Дмитрий Игоревич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

старший преподаватель кафедры общей физиологии  
Санкт-Петербургский государственный университет,  
кандидат биологических наук

Федорова Арина Александровна

«17» апреля 2026 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

Телефон: +7 (812) 328-20-00

Электронная почта: spbu@spbu.ru



ЗАВЕРЯЮ

*А. А. Федорова*  
*Ок Алла Александровна*

17.04.2026 г.