

противоположные, функции в физиологических и патофизиологических реакциях. Эти факты свидетельствуют о том, что традиционный взгляд на нейтрофил как на терминально дифференцированную эффекторную клетку сменился пониманием сложности и пластичности его функционального ответа, что ставит перед научным сообществом новые вопросы, связанные с механизмами регуляции этих процессов.

Ключевым этапом реализации эффекторных функций нейтрофилов является их выход из сосудистого русла в ткани, который обеспечивается многоступенчатым процессом трансэндотелиальной миграции. Соискатель отмечает, что состоятельность этого процесса напрямую зависит от морфофункционального состояния клеток, их энергетического и ферментативного потенциала, способности к адгезии и активной деформации, опосредованной перестройкой цитоскелета и модификацией поверхностных рецепторов.

Не менее сложной и актуальной задачей, на решение которой направлена работа, является изучение влияния бактерий на реализацию механизмов миграции. Проблема трехстороннего взаимодействия «нейтрофил – эндотелий – патоген» остается белым пятном, несмотря на то, что именно в таких условиях часто происходит срыв нормальной регуляции диапедеза и развивается патология. Следовательно, исследование Безрукова Н.А., направленное на комплексную оценку морфологических, механических и функциональных перестроек нейтрофилов при взаимодействии с эндотелием в норме, при активации различными хемоаттрактантами, а также в присутствии бактерий, является своевременным и востребованным. Полученные данные не только углубляют понимание фундаментальных основ функционирования врожденного иммунитета, но и создают научный базис для разработки альтернативных терапевтических стратегий, направленных на таргетную регуляцию миграции нейтрофилов без тотальной супрессии их защитных

свойств. Таким образом, актуальность диссертационной работы, ее теоретическая и практическая значимость полностью обоснованы.

Структура и объём диссертации, оценка содержания диссертационной работы.

В разделе «Введение» соискатель излагает основные положения, определяющие актуальность диссертационного исследования и степень научной разработанности темы, четко формулирует цель работы и задачи для ее достижения, раскрывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость исследования. В разделе также представлены ключевые положения, выносимые на защиту, отображён личный вклад автора, приведена информация о публикациях, дана информация о структуре и объеме диссертации и финансовой поддержке работы.

Первая глава «Обзор литературы» представляет собой всесторонний анализ современного состояния проблемы. Автором рассмотрены современные представления о биологии нейтрофилов, механизмах их привлечения в очаг воспаления, этапах и молекулярных основах трансэндотелиальной миграции, а также хемотаксиса. Проанализированы данные о фагоцитозе, механизмах гибели нейтрофилов в очаге инфекции, феномене обратной миграции и роли нейтрофилов в патогенезе заболеваний человека. Обзор отличается логичностью изложения, использованием актуальных литературных источников и обоснованно подводит к формулировке нерешённых вопросов, определивших постановку задач настоящего исследования.

Вторая глава «Материалы и методы исследования» детально описывает использованные экспериментальные подходы. В ней представлены методики выделения нейтрофилов, культивирования эндотелиальных клеток линии EA.hy926, приготовления бактериальных суспензий. Особого внимания заслуживает разработанный автором комплекс миграционных моделей: вертикальная модель трансэндотелиальной миграции, горизонтальная модель

миграции по градиенту хемоаттракции и проточная модель, имитирующая миграцию в условиях гидродинамического сдвига. Важнейшим методическим подходом исследования является применение зондовой микроскопии живых клеток в варианте сканирующей ион-проводящей микроскопии. Подробно изложены методы определения активных форм кислорода и азота в единичных клетках и клеточных популяциях с использованием наноамперометрического метода, методика наноинвазивного переноса, а также способ оценки энергетического потенциала мигрирующих нейтрофилов по содержанию гликогена. Применённые методы современны, адекватны поставленным задачам и обеспечивают достоверность полученных результатов.

Третья глава «Результаты и обсуждение» является центральной частью работы и содержит 6 разделов. В разделе 3.1 детально охарактеризована трансэндотелиальная миграция нейтрофилов в вертикальной модели: описаны её особенности, включая изменения эндотелиального монослоя, феномен обратной миграции и состояние нейтрофилов после диапедеза, исследованное методом сканирующей ионно-проводящей микроскопии. Раздел 3.2 посвящён горизонтальной модели миграции, в нём приведены количественные показатели миграционной активности и результаты высокоразрешающей визуализации клеток. В разделе 3.3 представлены данные о видоспецифичных особенностях миграции нейтрофилов в проточной системе, включая образование «нейтрофильных привязей» и агрегатов. Раздел 3.4 содержит результаты наноамперометрического определения АФК/АФА в единичных нейтрофилах при стимуляции бактериями и при адгезионном контакте с эндотелием, а также данные об активации эндотелиоцитов. В разделах 3.5 и 3.6 приведены сведения о популяционной продукции АФК нейтрофилами и об энергетике миграционного процесса. Каждый подраздел сопровождается обсуждением, в котором автор сопоставляет собственные данные с литературными, демонстрируя глубокое понимание предмета исследования.

В главе «Заключение» обобщены и проанализированы основные результаты работы, сформулированы итоговые выводы, которые полностью соответствуют поставленным задачам и отражают ключевые достижения исследования.

Выводы логично вытекают из результатов исследования, обоснованы и соответствуют цели и задачам диссертационного исследования.

Соответствие диссертации паспорту специальности.

На этом основании можно утверждать, что диссертационная работа Безрукова Николая Александровича **соответствует** паспорту специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных.

Соответствие автореферата диссертации её содержанию.

Автореферат диссертации полностью соответствует содержанию и результатам исследований, изложенным в диссертации.

Личный вклад соискателя в получении результатов исследования подтверждается публикациями.

Личный вклад соискателя в получении результатов исследования подтверждается его публикациями в рецензируемых журналах высоких категорий.

Степень достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Для достижения поставленной цели соискателем сформулированы адекватные задачи. Дизайн исследования и его методология структурированы в соответствии с целью и задачами. Работа проиллюстрирована в достаточном объеме для подтверждения объективности исследования. Основой достоверности полученных соискателем данных является достаточный объем экспериментального материала для проведения статистического анализа. Также, высокая степень достоверности полученных результатов обеспечивается использованием широкого набора современных методов, применением нескольких подходов к моделированию взаимодействия клеток;

наиболее важным высокотехнологичным методом диссертационного исследования стала сканирующая ион-проводящая микроскопия на уникальной лабораторной установке, дополненная конфокальной лазерной микроскопией, проточной цитофлуориметрией и рядом других методов. Эксперименты характеризуются тщательной проработанностью и наличием необходимых контролей. Результаты исследования подвергнуты статистической обработке с применением адекватных статистических методов, подтверждая достоверность полученных соискателем результатов и обоснованности сформулированных им выводов.

Теоретическая и практическая значимость полученных автором диссертации результатов.

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в существенном расширении фундаментальных представлений о механизмах регуляции трансэндотелиальной миграции нейтрофилов. Впервые продемонстрирована и количественно охарактеризована функциональная неоднородность популяции нейтрофилов в процессе диапедеза, ассоциированная с различиями в миграционной активности и объективно регистрируемыми изменениями модуля Юнга: от 500–600 Па в покое до 300–400 Па при диапедезе, и до 1000–1200 Па при миграции по поверхности эндотелия под действием бактериальных хемоаттрактантов. Выявлена субпопуляция нейтрофилов, переходящих в состояние анергии при бактериемии, с падением ригидности до 200–300 Па. Установлен факт видоспецифичности миграционного ответа нейтрофилов на грамположительные и грамотрицательные бактерии, а также показано, что биохимические хемоаттрактанты (LTB₄, ФНО α , LXA₄) самостоятельно не индуцируют направленного движения, но усиливают миграционные процессы, инициированные бактериями. Раскрыты механизмы двустороннего взаимодействия нейтрофилов с эндотелием: контакт интактных нейтрофилов не активирует эндотелиоциты, тогда как взаимодействие с праймированными

клетками вызывает гиперпродукцию АФК/АФА эндотелием, причём процесс носит пороговый характер и достигает насыщения при внутриклеточной концентрации порядка 15 мкМ. Впервые визуализирован респираторный взрыв праймированных нейтрофилов при адгезионном контакте с эндотелием, а также феномен обратной миграции.

Практическая значимость работы определяется возможностью использования полученных данных для разработки подходов к таргетной регуляции миграционной активности нейтрофилов. Выявленные закономерности альтерации эндотелиоцитов при бактериемии, включая формирование фибриллярных отростков и образование на них NETs, а также данные о видоспецифичности миграционного ответа открывают перспективы для прогнозирования характера воспалительной реакции при инфекциях различной этиологии. Сведения о пороговом характере активации эндотелия и роли биохимических хемоаттрактантов как усилителей миграции создают основу для поиска фармакологических агентов, модулирующих выраженность диапедеза. Разработанные методические подходы (вертикальная и горизонтальная модели миграции, проточная модель, методика наноинвазивного переноса) обладают самостоятельной практической ценностью и могут быть рекомендованы к использованию в научно-исследовательских лабораториях. Выводы и рекомендации являются полностью обоснованными, их значимость для науки и практики не вызывает сомнений.

Научная новизна результатов исследований. Впервые установлено, что основным вариантом изменения морфологии эндотелиоцитов в присутствии бактерий является уменьшение площади клеток и формирование ими фибриллярных структур. На этих фибриллярных отростках, как впервые показано в работе, нейтрофилы способны формировать нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETs). Данный факт представляет несомненный интерес для понимания механизмов врожденного иммунитета. Впервые

продемонстрирована и документирована морфологическая и механическая неоднородность популяции нейтрофилов, проявляющаяся непосредственно в ходе реализации трансэндотелиальной миграции.

В отношении механизмов направленного движения клеток впервые выявлено, что направленная миграция нейтрофилов обусловлена бактериальными хемоаттрактантами и характеризуется видоспецифичностью, тогда как биохимические хемоаттрактанты выполняют вспомогательную роль, усиливая данный процесс. Метод высокоразрешающей микроскопии впервые позволил визуализировать феномен обратной миграции нейтрофилов, что следует отнести к несомненным методическим и фактологическим достижениям работы.

Существенное внимание в диссертации уделено коллективным формам поведения клеток. Впервые показано, что нейтрофилы в процессе миграции способны образовывать крупные агрегаты (в горизонтальной и проточной системах) или демонстрировать феномен роения (в вертикальной модели миграции). Установлено, что такое поведение клеток выполняет двоякую функцию: во-первых, оно приводит к формированию «зон входа», облегчающих последующую миграцию нейтрофилов; во-вторых, возрастание числа праймированных нейтрофилов, взаимодействующих с эндотелиоцитами, вызывает активацию последних, что сопровождается синтезом ими активных форм кислорода и азота (АФК/АФА). Впервые зафиксирован респираторный взрыв праймированных нейтрофилов, возникающий непосредственно при адгезионном контакте с эндотелиальным монослоем.

Совокупность перечисленных результатов обладает несомненной научной новизной и вносит существенный вклад в понимание механизмов регуляции миграционной активности нейтрофилов.

Публикации. Основные теоретические и практические результаты диссертации опубликованы в 28 научных публикациях, 12 из которых

опубликованы в журналах, включённых Высшей аттестационной комиссией России в список изданий, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание учёной степени кандидата и доктора наук.

Результаты работы докладывались на научно-технических конференциях и прошли апробацию в научных дискуссиях. Опубликованные работы в достаточной степени отражают содержание диссертации.

Замечания по диссертационной работе:

Существенных замечаний к диссертационной работе не выявлено, обнаружен ряд неточностей, опечаток, синтаксических и стилистических ошибок, которые, однако, не мешают прочтению и пониманию работы, выполненной на высоком экспериментальном и теоретическом уровне.

Из стилистических недочётов можно отметить стиль написания главы «Материалы и методы исследования», в которой «кровь разводилась...», «нейтрофилы промывались...», «нейтрофилы взвешивались...». В таких формулировках не совсем видна роль автора, если все объекты делали действия над собой самостоятельно. Более принятый стиль изложения предусматривает, что «кровь разводили...», «нейтрофилы промывали...», что касается «взвешивания нейтрофилов...» (можно предположить, что от слова «взвесь»), то автор сам далее поясняет, что в итоге была получена суспензия, и в таком случае следует указать, что «нейтрофилы ресуспендировали».

Обнаружено некоторое количество опечаток и некорректных расстановок знаков препинания, таких как на стр. 97 рукописи, где «были проведены эксперименты...», а причастный оборот выделен не запятыми, а тире.

Из обнаруженных неточностей можно отметить, что несмотря на сильный набор статистических методов анализа, удачно выбранных и успешно применённых автором, в каждом из подразделов главы «Материалы

и методы исследования» следовало четко указать какое количество независимых биологических повторов было выполнено в каждом эксперименте. Чтобы понять это приходится проводить расследование в главе «Результаты и обсуждение», причем не до конца остается понятным, что же такое «n» в ряде случаев – число отдельных клеток или чашек Петри с образцами культуры, или полей зрения, а также сколько именно брали для анализа клеток, исследованных трудоемким высокотехнологичным методом зондовой микроскопии.

К неточностям можно отнести и отсутствие указателей (стрелок) на объектах исследования, где не всегда очевидно, на что именно обращает внимание автор и где та клетка, о которой он говорит. Местами текстовые пояснения о том, про какую клетку идет речь тоже ощущаются неоднозначными, так, например, на стр. 86 «обратное отдаление правой клетки от верхней».

«Формирование фибрилл эндотелиоцитами» является не вполне удачным термином, поскольку в биологии фибриллами принято называть или надмолекулярные структуры, или, что реже, структуры, сформированные множеством клеток. Дальнейшее пояснение автора решает данный казус, поскольку автор уточняет, что речь идет о фибриллярных отростках клеток.

Автором впервые получен ряд уникальных результатов, раскрывающих динамику клеточных популяций при взаимодействии друг с другом в различных условиях, для чего им с успехом разработаны и адаптированы высокотехнологичные экспериментальные модели для изучения трансэндотелиальной миграции нейтрофилов. Как известно, любая модель имеет граничные условия и некоторые особенности, влияющие на трактовку результатов, которые в качестве дискуссионных вопросов можно предложить обсудить автору.

1. С точки зрения автора с чем может быть связана выявленная бактериальная видоспецифичность миграционного ответа нейтрофилов? Какие компоненты бактериальных клеток или секретируемые факторы, вероятнее всего, определяют различия в направленности миграции, наблюдаемые, в частности, между *S. aureus* и *E. faecalis*? С учетом выбранной модели и лимита пропускания молекул через диализную камеру, которой задавали градиент, было бы интересным в порядке дискуссии узнать о потенциальных молекулярных кандидатах, градиент которых обусловил полученные результаты.

2. Внимательного обсуждения и дискуссии требуют результаты, полученные с использованием «биохимических хемоаттрактантов» (LTV4, ФНО α , LXA4), для которых как для будучи известных медиаторов воспаления, в других экспериментальных моделях (например, при инъекции *in vivo*) в ряде работ показан не только функциональный эффект, но и его зависимость от градиента. Поскольку автором диссертационного исследования показано, что самостоятельно эти молекулы не индуцируют направленной миграции нейтрофилов, а лишь усиливают ответ на бактериальные стимулы, то данная находка нуждается в более глубоком обсуждении. Следует учесть, что из выбранных хемоаттрактантов ФНО α является белком, проницаемость через диализную мембрану которого сильно ограничена, а лейкотриен и липоксин, хотя и являются малыми молекулами, но в силу своей гидрофобности с трудом переносятся в водной среде. Нельзя ли предположить, что в условиях использованной модели низкие концентрации, обусловленные плохим массопереносом, могли не сформировать достаточного для направленности клеток градиента, однако вызвали функциональный общий эффект, усиливающий действие бактериальных аттрактантов.

Высказанные незначительные замечания и вопросы, требующие большей дискуссии, ни в коем случае не влияют на ценность и актуальность

диссертационной работы и не снижают позитивного впечатления о добротном сделанном диссертационном исследовании Безрукова Н. А.

Заключение.

Диссертационная работа Безрукова Николая Александровича на тему «Морфомеханический и функциональный статус нейтрофила в модели экспериментальной бактериемии» удовлетворяет требованиям Положения о присуждении учёных степеней, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук (Постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 с изменениями от 16 октября 2024 г.), а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. Физиология человека и животных.

Диссертация, автореферат и отзыв на диссертацию рассмотрены на заседании Департамента медицинской биологии и биотехнологии, протокол № 1 от «18» мая 2026 г. На заседании Департамента медицинской биологии и биотехнологии присутствовало 16 человек.

Отзыв подготовил:

Декан факультета биомедицины,
директор Департамента
медицинской биологии и
биотехнологии Института мирового
океана ДВФУ, канд. биол. наук,
доцент

Кумейко Вадим Владимирович

26 мая 2026 г.

Сведения о ведущей организации: «Дальневосточный федеральный университет» (ДВФУ)
690922, Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10
тел. (423) 243 34 72, факс (423) 243 23 15
Эл. почта: rectorat@dvfu.ru <http://www.dvfu.ru>

