

ОТЗЫВ

официального оппонента, профессора кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии лечебный факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, доктора медицинских наук, профессора Дубовой Татьяны Клеониковны на диссертацию Кожиной Кристины Витальевны «Влияние олигопептида P199 на функциональную активность дермальных фибробластов кожи человека в эксперименте *in vitro*», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 – «Патологическая физиология».

Актуальность темы выполненной работы

Диссертационная работа Кожиной Кристины Витальевны «Влияние олигопептида P199 на функциональную активность дермальных фибробластов человека в эксперименте *in vitro*» посвящена изучению особенностей возрастных изменений кожи и возможности их коррекции с помощью олигопептида P199. Актуальность данного диссертационного исследования обусловлена поиском и появлением на мировой научной и клинической арене радикально нового поколения средств и методов, которые помогают не только замедлить процесс старения, но и сохранить высокое качество жизни. Известно, что старение является естественным процессом угасания биологических функций всего организма. Однако до настоящего времени остаются неизвестными основные механизмы, запускающие процесс старения. Одним из первых внешних проявлений увядания организма является старение кожи. Такие признаки старения кожи, как морщины, дряблость, сухость и пигментация для многих, особенно для женщин, доставляют дискомфорт и психологические переживания, которые влияют на качество жизни. Возрастные изменения кожи ассоциированы с изменениями, происходящими как на клеточном, так и на внутриклеточном уровне, и

связаны с увеличением количества поврежденной ДНК, снижением пролиферативной и миграционной активности клеток, уменьшением синтеза белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами кожи человека и др. Все это приводит не только к увяданию кожи, образованию морщин и снижению ее защитных свойств, но и к развитию аномального регенеративного ответа на повреждение – образованию гипертрофических и келоидных рубцов.

В настоящее время успешно разрабатываются новые средства и методы борьбы с возрастными изменениями кожи. Одним из методов регенерации и омоложения является клеточная пептидотерапия. В ее основе лежит принцип использования в интересах лечения, поддержания и коррекции здоровья человека эволюционно древнейшей системы естественной регуляции межклеточных взаимодействий и внутриклеточной репарации органов и тканей короткими белками - пептидами, которые представляют собой многочисленные комбинации фрагментов аминокислот.

Однако исследование их биоэффективности, влияния на функциональный и репаративный потенциал клеток остаются практически неизученными.

Поэтому представленное исследование является чрезвычайно важным, целесообразным и своевременным, так как поможет не только решить проблему образования рубцовой ткани, возрастной физиологической регенерации и репарации кожи и всего организма, но и открывает новые пути выработки стратегии восстановительной и корректирующей медицины будущего.

Достоверность и новизна результатов

В своей работе автор для экспериментов использовал выделенную и охарактеризованную им стандартизированную культуру дермальных фибробластов человека ранних пассажей, которая может в течение длительного времени храниться в криобанке. Это позволило получить стандартную клеточную модель для всех опытов, так как именно

фибробласты являются основным источником белков внеклеточного матрикса дермы кожи, и именно данный тип клеток претерпевает значительные изменения при повреждении кожи и в процессе старения. Для моделирования процессов старения кожи автором был предложен оригинальный экспериментально обоснованный подход увеличения времени культивирования и показано, что клетки 4 пассажа по своим характеристикам соответствуют фибробластам молодой кожи, а 18 пассажа имеют характерные признаки репликационного старения клеток. В условиях 3D культивирования были получены клеточные сфероиды, представляющие собой удобную и простую клеточную модель, которая позволяет проводить одномоментный анализ более 256 сфероидов в эксперименте в стандартных условиях, что улучшает качество дальнейшего статистического анализа и может быть использована для скринингового анализа. Данная 3D модель имеет некоторые преимущества перед монослойной клеточной культурой, так как по взаимодействию клеток приближена к нативной ткани. Однако автор не противопоставляет ее 2D культуре, а представляет как новый, удобный метод для более углубленного исследования изменений функционального потенциала клеток.

Благодаря удачно выбранным моделям исследования и тщательно продуманному дизайну эксперимента Кристина Витальевна в своей работе впервые получила достоверный вывод о том, что олигопептид P199 повышает функциональную активность фибробластов кожи человека, о чем свидетельствует увеличение скорости клеточной пролиферации, и оказывает дозозависимый эффект на синтез тканеспецифичных белков: цитокератина 19, эластина и фибронектина.

Впервые выявлено уникальное свойство данного препарата – способность индуцировать экспрессию гена, ответственного за синтез важнейшего белка внеклеточного матрикса, характерного для эмбриональной и неонатальной дермы - коллагена IV типа, которая

утрачивается в процессе старения кожи. Показано положительное влияние олигопептида P199 на процесс формирования сфероидов «старыми» клетками.

Повреждение сфероидов с помощью лазерной микродиссекции явилось удачной моделью повреждения ткани, позволившей автору оценить влияние препарата на его репаративные свойства. Было установлено, что под влиянием олигопептида P199 происходит восстановление дефекта за счет увеличения миграции фибробластов в зону повреждения, а также увеличения содержания провоспалительных факторов – циклооксигеназы 1 и простагландина E2.

Совокупность полученных в результате выполненной работы экспериментальных данных о высоком цитопротекторном действии олигопептида P199 позволило автору работы Кристине Витальевне Кожиной обосновать целесообразность его использования в клинической практике, как качественно нового и весьма перспективного метода восстановления и коррекции возрастных изменений кожи.

Высокое качество экспериментального материала, статистический анализ полученных данных и подтверждение основных выводов в независимых повторях не вызывают никаких сомнений в их достоверности.

Результаты работы представлены на международных конференциях, материалы которых опубликованы и приведены в списке публикаций по теме диссертации.

Общая структура и содержание диссертационной работы

Диссертация К.В. Кожиной написана по общепринятому плану, логична построена. Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста, представлены все необходимые по требованиям ВАК разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Диссертационная работа аккуратно оформлена и хорошо

иллюстрирована, содержит 46 рисунков и 3 таблицы. В списке цитируемой литературы приведены 135 источников, из которых 18 написаны на русском языке и 117 – на английском.

Во введении четко сформулированы общая характеристика работы, цели и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость. Эта часть диссертации дает ясное представление о теме работы и существенно облегчает восприятие дальнейшего материала.

Обзор литературы изложен на 41 странице машинописного текста, органично разбит на главы, написан хорошим научным языком. В первой главе подробно рассмотрены механизмы клеточного старения кожи и регенерации фетальной и взрослой кожи. Проанализирован вклад эндогенных и экзогенных факторов в развитие возрастных изменений. Описаны механизмы, ответственные за синтез и деградацию белков внеклеточного матрикса. Во второй главе дан полноценный обзор используемых в мировой косметологической практике препаратов, используемых для замедления процессов старения и восстановления нормального функционирования клеток кожи. Показана перспективность использования клеточных технологий для получения биологически активных экстрактов, способных восстановить белковосинтетическую функцию стареющих клеток. Уделено внимание синтетическим олигопептидам – альтернативе клеточным пептидам животного и растительного происхождения, которые в последние годы нашли широкое применение в фармацевтической медицине. Также в обзоре освещено современное состояние проблемы получения и культивирования клеток человека и животных и продемонстрирована возможность использования культур клеток для получения биологически активных препаратов, а также в качестве моделей моделирования процессов старения *in vitro* и для исследования эффективности лекарственных средств. Таким образом, обзор литературы содержит всю информацию, необходимую для понимания исследования и полученных результатов.

Глава «Материалы и методы» содержит исчерпывающее описание протоколов и методик, примененных в процессе выполнения диссертационного исследования. Все эксперименты и анализ результатов были выполнены лично автором или при его участии. В своей работе Кристина Витальевна использует широкий спектр современных клеточных, биохимических и молекулярно-биологических подходов. Это методы цитраферной микроскопии, гистологии, флуоресцентного и иммуноцитохимического, а также молекулярного анализа. Используемые автором методы трудоемки, высокоточные, широко распространены для анализа и соответствуют поставленным задачам. Методы статистической обработки полученных результатов позволяют не сомневаться в их достоверности.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из восьми разделов, которые хорошо структурированы и логически связаны. В каждом разделе автор тщательно описывает и подробно обсуждает полученные данные в виде рисунков и графиков, заканчивая каждый раздел небольшим заключением.

В первых двух разделах автор дает подробное описание и характеристику полученной ею монослойной культуры дермальных фибробластов кожи человека. С помощью морфологического и иммуноцитохимического анализа автор показывает функциональные различия между культурой клеток на 18 пассаже («стареющими» фибробластами) и на 4 пассаже («молодыми» фибробластами): увеличение «стареющих» клеток в размерах, снижение пролиферации и синтеза тканеспецифических маркеров. После тщательного подбора разведений олигопептида p199 на основании жизнеспособности и пролиферативной активности фибробластов на разных пассажах, автор в четвертом и шестом разделах приводит результаты исследования по влиянию подобранных концентраций олигопептида на синтез «стареющими» фибробластами тканеспецифических маркеров в сравнении с «молодыми» клетками в 2D и

3D условиях культивирования: показано увеличение синтеза цитокератина 19, эластина, фибронектина и коллагена III типа. Примечательно, что автору удалось выявить ранее неизвестный факт – активацию синтеза коллагена IV типа в дермальных фибробластах кожи человека под воздействием олигопептида p199. В шестом разделе автор описывает результаты исследования, где показано, что процесс образования клетками сфероидов также зависит от «возраста» и функциональной активности клеточной культуры. Репаративный потенциал фибробластов под влиянием олигопептида p199 Кристина Витальевна анализировала на монослойной культуре, оценивая изменение в скорости миграции клеток, и в 3D культуре – на уникальной модели повреждения сфероидов с помощью наносекундного лазерного скальпеля, по скорости репарации повреждения. Автором убедительно показано, что олигопептид p199 способен стимулировать репаративный потенциал клеток, о чем свидетельствует быстрое восстановление монослоя клеток и целостность структуры сфероида.

В заключительной части работы представлены выводы и практические рекомендации, в которых отражены основные результаты диссертации и их значение для биомедицинских исследований и клинической практики.

Ценность для науки и практики результатов работы

Автором впервые проведен анализ поведения «стареющих» дермальных фибробластов в 3D культуре и установлено, что фибробласты на поздних пассажах (после 18 пассажа) теряют способность формировать сфероиды, а добавление синтетического олигопептида p199 в ростовую среду приводит к восстановлению сфероидообразования.

Для анализа репарационных эффектов изучаемого олигопептида впервые была применена 3D модель повреждения клеточной структуры – сфероида – с помощью микродиссекции наносекундным лазерным скальпелем. Это позволило получить новые данные о цитопротекторном влиянии олигопептида p199 на процессы регенерации клеточных сфероидов. Полученные данные показывают, что разработанные 2D и 3D

клеточные модели повреждения дермальных фибробластов могут быть использованы для изучения механизмов регенерации и оценки эффективности новых препаратов, стимулирующих репарацию кожи.

Впервые на 3D культуре «стареющих» фибробластов показано, что олигопептид p199 запускает механизмы, приводящие к активизации и индукции синтеза коллагена IV типа, что свидетельствует об активации генов, находящихся в неактивном состоянии и может быть использовано в разработке новых методов лечения повреждений кожи и коррекции процессов старения.

Данные о про-репарационных эффектах p199, приводящих к изменению профиля синтеза белков внеклеточного матрикса и провоспалительных факторов, имеют теоретическое и практическое значение для исследований механизмов старения и безфиброзной репарации кожи.

Очевидно, что дальнейшее изучение механизмов активизации заблокированных функциональных резервов отдельных тканей позволит разработать новые методы восстановления функциональной активности всего организма

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные 2D и 3D клеточные модели могут быть использованы для проведения фундаментальных исследований по изучению механизмов клеточного старения и процессов репарации кожи, а также для проведения скрининга лекарственных и косметических препаратов.

Исследуемый олигопептид p199 можно рекомендовать в качестве эффективного, экономичного и доступного препарата для борьбы, как с возрастными изменениями кожи, так и при ее повреждении.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

Полученные автором данные опубликованы в 6 статьях, в том числе 5 работ в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, и представлены в виде 3 тезисов докладов на международных конференциях.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации Кожиной К.В. полностью соответствуют основным положениям диссертации, в нем отражены актуальность темы, научная новизна, практическая значимость, основные результаты и их обсуждение.

Замечания

Имеется несколько непринципиальных замечаний, которые носят скорее рекомендательный характер и не снижают ценности представленной диссертации.

1. В обзоре литературы следовало более подробно осветить тему, посвященную внутриклеточным механизмам старения клеток.
2. Хотелось бы, чтобы автор проанализировал и обосновал более четкую взаимосвязь между воздействием пептида р199 и активацией синтеза коллагена IV типа.

Заключение

Диссертация Кожиной Кристины Витальевны «Влияние олигопептида р199 на функциональную активность дермальных фибробластов кожи человека в эксперименте *in vitro*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 - Патологическая физиология, является завершенной и цельной научно-квалификационной работой. Все представленные выводы обоснованы и базируются на самостоятельно полученных автором материалах и результатах, их обработке и интерпретации. Оформление работы отвечает всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Исследование Кожиной К.В. посвящено актуальной и важной проблеме для современного общества, проведено с использованием обширного набора различных современных методов, содержит уникальные результаты, исходя из которых, автор формулирует научно-практические рекомендации. По актуальности, новизне, научно-практической значимости диссертация полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденным

постановлением правительства РФ от 24.09.13 номер 842 (с изменениями в редакции постановлений Российской Федерации №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г.), а ее автор, Кристина Витальевна Кожина, заслуживает искомой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.03 - Патологическая физиология.

Профессор кафедры
гистологии, эмбриологии и цитологии
лечебного факультета ФГБОУ ВО
«Российский национальный
исследовательский медицинский
университет имени Н.И. Пирогова»
Минздрава России,
Доктор медицинских наук, профессор,



Дубовая Т.К.

Дубовая Татьяна Клеониковна: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1.
E-mail: gusvbr@mail.ru Тел.: 8 (495) 434 40 83

Подпись профессора Т.К. Дубовой заверяю,
Ученый секретарь ФГБОУ ВО РНИМУ
им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ,
доктор медицинских наук, доцент

Н. 05. 2017



Милушкина О. Ю.