

ОТЗЫВ

официального оппонента, заведующего кафедрой клинической физиологии и функциональной диагностики медико-биологического факультета ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, доктора медицинских наук, профессора, члена-корреспондента РАН Ткаченко Сергея Борисовича 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

Развитие технологий и медицины в современном мире позволило увеличить продолжительность жизни, удлинить ее репродуктивный и социально-активный периоды. Это привело к возникновению проблемы возраст-ассоциированных заболеваний. Группа заболеваний, затрагивающая все органы и ткани человека, связана с возрастным угнетением функций клеток и включает в себя такие широко распространенные заболевания как остеоартроз, остеопороз, нейродегенеративные заболевания, и, в том числе, некоторые кожные заболевания, например, буллезный пемфигоид Левера. Более того, снижение функциональной активности клеток кожи ведет и к снижению защитного и регенеративного потенциала самой ткани. С возрастом кожа человека утрачивает способность к безфиброзному заживлению повреждений, чаще возникает аномальный регенеративный ответ дермальных фибробластов, приводящий к развитию гипертрофических и келоидных рубцов. Образуя контрактуры, рубцы препятствуют нормальной физиологии кожи, нарушается водно-солевой обмен,

дыхательная и экскреторная функции, уменьшается иммунный ответ. Стоит также отметить такой важный социальный аспект как эстетическое восприятие человека: перед каждым человеком в течение жизни возникает вопрос об омоложении клеток кожи для улучшения качества жизни, поднятия собственного социального статуса и самооценки. В настоящее время, в качестве одних из перспективных препаратов для преодоления возрастных изменений кожи на клеточном уровне рассматривают олигопептиды. Для данной группы веществ характерно: высокая степень проникновения в ткани, полифункциональное воздействие на внутриклеточные процессы и участие в клеточном метаболизме. Эти свойства могут привести как к положительному, так и к отрицательному ответу клеток на воздействие пептидов. Поэтому необходимо создание восприимчивых клеточных моделей и тщательное исследование на них изменений клеточного поведения под воздействием внешних факторов. Из этого следует, что диссертационная работа Кожиной Кристины Витальевны, посвященная анализу функциональной активности дермальных фибробластов кожи человека в присутствии олигопептида p199 *in vitro* является актуальным и целесообразным исследованием.

Достоверность и новизна результатов

Все эксперименты в представленном исследовании были проведены в контролируемых и стандартных условиях *in vitro*, выполнено достаточное количество повторов, проведен статистический анализ полученных данных, что свидетельствует о высокой степени достоверности результатов.

В диссертационной работе автор использует для анализа внутриклеточных процессов, с одной стороны, широко распространенную клеточную модель – 2D культуру «стареющих» дермальных фибробластов кожи человека, с другой, применяет к ней оригинальный и эффективный подход, помещая «стареющие» клетки в условия 3D культивирования.

Таким образом, на новой модели, подходящей для серийного анализа, автору удалось убедительно доказать, что «стареющие» клетки теряют способность формировать клеточные агрегаты – сфероиды, что, вероятно, связано с угнетением синтетической активности фибробластов. Впервые автором достоверно установлено, что добавление олигопептида p199 стимулирует в дермальных фибробластах синтез цитокератина 19, эластана, фибронектина и коллагена III типа и восстанавливает способность клеток к сфероидогенезу. В представленном исследовании впервые выявлено, что синтетический пептид оказывает омолаживающее действие на клетки, индуцируя как в 2D, так и в 3D культуре клеток синтез коллагена IV типа, гены которого, как полагали ранее, с возрастом переходят в неактивное состояние. Впервые автором применена техника повреждения сфероидов из дермальных фибробластов с помощью наносекундного лазерного скальпеля и показан прорегенерационный эффект олигопептида p199.

Представленный в диссертации иллюстративный материал безукоризнен, все полученные автором экспериментальные данные абсолютно оригинальны, а результаты работы достоверны и не вызывают сомнений.

Общая структура и содержание диссертационной работы

Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста, содержит 46 рисунков и 3 таблицы. В списке цитируемой литературы приведены 135 источников, из которых 18 русскоязычных и 117 – английском. Манускрипт диссертации имеет стандартную структуру и включает все необходимые по требованиям ВАК разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы».

В главе «Введение» автор описывает актуальность данного исследования, четко формулирует цель и задачи работы и приводит

обоснование ее научной новизны, теоретической и практической значимости.

Обзор литературы достаточно обширен и состоит из пяти глав. Автором собран и тщательно проанализирован большой объем литературы, имеющей непосредственное отношение к тематике диссертационного исследования. В первом разделе приведена общая исчерпывающая информация о строении кожи человека и входящих в нее клеточных популяциях. Во втором разделе обзора автором приведены и описаны основные из известных на сегодняшний день механизмы старения кожи. Далее автором подробно разбираются исследования, посвященные регенерации фетальной и взрослой кожи. В этом разделе автором приведены классические и современные данные различных литературных источников, указывающие на непосредственную вовлеченность в процессы заживления ран дермальных фибробластов и белков внеклеточного матрикса, особенно коллагенов I и III типов. Далее автор анализирует существующий рынок препаратов, влияющих на возрастные изменения и репарацию кожи, а также механизмы их воздействия. Завершает обзор литературы раздел, посвященный рассмотрению эволюции клеточных моделей, используемых в исследованиях в области патофизиологии, клеточной биологии и геронтологии. Представленная в этом разделе информация подчеркивает актуальность и своевременность проведенного диссертационного исследования. Таким образом обзор литературы дает детальное представление о текущем состоянии научной проблемы, в достаточной степени проиллюстрирован, материал преподносится последовательно и грамотно.

В главе «Материалы и методы» приведено подробное описание протоколов выделения, 2D и 3D культивирования и анализа дермальных фибробластов кожи человека с использованием целого комплекса сложных и трудоемких методов: цейтраферной микроскопии, морфометрического анализа, гистологии, флуоресцентного и иммуноцитохимического, а также молекулярного анализа. Все протоколы четко и грамотно изложены,

используемые автором методы соответствуют поставленным задачам и достаточны для их решения.

Глава «Результаты и обсуждение» диссертационной работы представляет собой цельное законченное исследование и состоит из восьми разделов. Первая часть главы посвящена описанию и характеристике выделенных из кожи человека дермальных фибробластов, а также сравнительному анализу свойств клеток на 4 пассаже («молодых») и на 18 пассаже («стареющих»). Далее автором изучены изменения пролиферации, профиля синтеза специфических белков и миграционной «стареющих» фибробластов при добавлении различных концентраций олигопептида p199 как в 2D, так и в 3D культуре. Отдельно следует отметить применение в диссертационной работе двух тестов, позволяющих косвенно оценить прорегенерационный потенциал анализируемого олигопептида – тест «царапина» на монослое клеток и оригинальный, впервые представленный тест на 3D культуре клеток – повреждение сфероидов с помощью наносекундного лазерного скальпеля. После повреждения, автором также был проведен молекулярный анализ синтеза в поврежденных сфероидах провоспалительных факторов.

Главы «Заключение» и «Выводы» полностью соответствуют полученным данным.

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

Автором показано, что, по сравнению с клетками на 4 пассаже, фибробласты на 18 пассаже увеличиваются в размерах, снижается уровень их пролиферации и синтетической активности специфических маркеров: цитокератина 19, эластина, коллагенов I и III типов, а также фибронектина. Таким образом, автор доказательно обосновывает разделение экспериментальных культур на «молодые» и «стареющие» клетки. Используя различные концентрации олигопептида с повторами

экспериментов, автору удалось выявить зависимость стимулирующего эффекта от количества пептида на пролиферативную активность клеток, а также на синтез белков внеклеточного матрикса, преимущественно на коллаген IV типа. Индукция синтеза коллагена IV типа является важным открытием данного исследования, так как данный тип коллагена относится к белкам базальной мембраны, и его синтез в дермальных фибробластах ранее был отмечен только в фетальной коже. Таким образом, автором сделано предположение, что олигопептид p199 участвует в активации генов, которые, как предполагалось, находятся в неактивном состоянии. С использованием 3D культуры сфероидов и иммуноцитохимического анализа, автором было убедительно показано, что коллаген IV типа присутствует не только в клетках, но и образует сложную сеть внеклеточного матрикса, пронизывающую всю структуру сфероида. После нанесения повреждения сфероидам, автором наглядно продемонстрировано с помощью метода прижизненного анализа, что олигопептид p199 ускоряет восстановление трехмерной клеточной структуры. Вместе с данными о повышении миграционной активности «стареющих» фибробластов в 2D культуре, полученные результаты свидетельствуют о высоком прорегенерационном эффекте олигопептида p199.

Таким образом, приведенные автором научные положения, выводы и рекомендации являются абсолютно обоснованными.

Ценность для науки и практики результатов работы

Диссертационное исследование Кристины Витальевны Кожиной несомненно представляет теоретический и практический интерес для биомедицинских наук и расширяет представление о применении клеточных моделей для исследований в области патологической физиологии и геронтологии. 2D и 3D клеточные модели повреждения дермальных фибробластов могут быть использованы для скринингового анализа и тестирования различных терапевтических препаратов, а также

как научная модель исследования внутриклеточных процессов. Данные по индукции синтеза коллагена IV типа в 2D и 3D культуре «стареющих» фибробластов дермы человека с помощью олигопептида p199 имеют теоретическое значение для изучения активации генов, находящихся в неактивном состоянии, и могут быть использованы в разработке новых методов лечения повреждений кожи и коррекции процессов старения. Данные о про-репарационных эффектах p199, приводящих к изменению синтеза белков внеклеточного матрикса и провоспалительных факторов, имеют теоретическое и практическое значение для патологической и нормальной физиологии, а также терапии повреждений кожи и косметологии.

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. Полученные культуры дермальных фибробластов кожи человека могут быть рекомендованы для использования для оценки биологической активности, биобезопасности и цитотоксичности косметических препаратов. Исследуемый олигопептид p199 можно рекомендовать в качестве самостоятельного препарата для борьбы как с возрастными изменениями кожи, так и при ее повреждении.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

Результаты диссертационной работы 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. Публикации соответствуют содержанию экспериментальной части работы.

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

В целом работа хорошо написана, грамотно и аккуратно оформлена, но не лишена некоторых недостатков, некоторые вопросы остались неразрешенными. Так, в обзоре литературы автором не до конца раскрыт вопрос роли внеклеточного матрикса и провоспалительных факторов в репарации кожи. Есть ли у автора предположения о том, чем обеспечено полифункциональное воздействие олигопептида p199? Каким образом может быть осуществлена индукция синтеза коллагена IV?

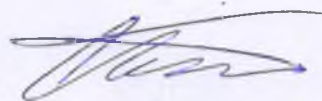
Однако эти замечания скорее носят рекомендательный характер и не влияют на общую высокую оценку диссертационного исследования. Положения, выносимые на защиту, хорошо и четко сформулированы, поставленные задачи полностью выполнены, результаты оригинальны, выводы обоснованы и подкреплены необходимым количеством экспериментальных данных.

Заключение

Диссертация Кожиной Кристины Витальевны «Влияние олигопептида p199 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 законченным научным исследованием. 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.

заведующий кафедрой клинической физиологии
и функциональной диагностики
Медико-биологического факультета
ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия
непрерывного профессионального
образования» Минздрава России,
Доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН



Ткаченко С.Б.

Ткаченко Сергей Борисович: 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр.1.
E-mail: doc4200@yandex.ru
Тел.: 8 (495) 256-23-31

Подпись член-корр. Ткаченко заверяю,
Ученый секретарь ФГБОУ ДПО РМАНПО
Минздрава РФ,
Кандидат медицинских наук, профессор

10.05.2017



Савченко Л.М.