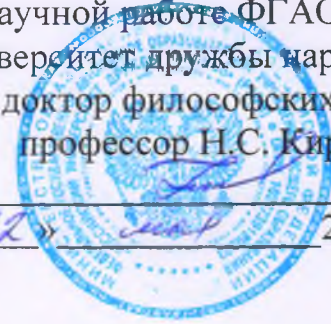


УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор – проректор
по научной работе ФГАОУ ВО
«Российский университет дружбы народов»
доктор философских наук,
профессор Н.С. Кирабаев

« 12 » _____ 2017 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» о значимости диссертационной работы Кожиной Кристины Витальевны «Влияние олигопептида p199 на функциональную активность дермальных фибробластов кожи человека в эксперименте *in vitro*», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Актуальность диссертационной темы

Диссертационная работа К.В. Кожиной «Влияние олигопептида P199 на функциональную активность дермальных фибробластов человека в эксперименте *in vitro*» посвящена изучению влияния олигопептида p199 на возрастные изменения кожи и репарационную активность дермальных фибробластов после повреждения в эксперименте.

Старение кожи является одним из первых внешних проявлений увядания организма и для многих становится негативным психоэмоциональным фактором, который может влиять на качество жизни. Поэтому важнейшим психологическим и социальным аспектом данной проблемы является профилактика и борьба с внешними признаками старения: морщинами, дряблостью, сухостью, пигментацией, а

также снижением ее защитных и репаративных свойств, что приводит к возникновению гипертрофических и келоидных рубцов в процессе заживления ран. Наиболее перспективным методом терапии гипертрофических и келоидных рубцов рассматривают коррекцию компонентного состава внеклеточного матрикса кожи через воздействие на дермальные фибробласты. Однако, сложность решения данной медицинской проблемы заключается в том, что старение является естественным процессом угасания биологических функций и связано с возрастными изменениями на уровне целостного организма. В настоящее время успешно развивается целая индустрия, направленная на разработку средств и методов профилактики и борьбы с возрастными изменениями кожи. Существует целый ряд антивозрастных препаратов, и с каждым годом их количество увеличивается. Все это обуславливает необходимость разработки адекватных экспериментальных клеточных моделей, с помощью которых можно будет изучать особенности возрастных изменений в коже и проводить скрининговые исследования лекарственных и косметических препаратов. Поэтому работа К.В. Кожиной, направленная на получение стандартной культуры диплоидных фибробластов кожи человека и последующее использование ее в качестве модели для изучения фундаментальных механизмов в регулировании функциональной и репаративной активности дермальных фибробластов, а также для тестирования препаратов, в частности олигопептида P199, является чрезвычайно важной и актуальной.

Научная новизна

Автором впервые изучены изменения в пролиферации, миграции и синтезе белков внеклеточного матрикса в фибробластах кожи человека в 2D и 3D условиях при добавлении в культуральную среду олигопептида p199. Впервые для исследования функциональной активности молодых и

«стареющих» фибробластов кожи человека была применена 3D культура (клеточные сфероиды) и показано, что «стареющие» фибробласты теряют способность формировать сфероиды, а добавление синтетического олигопептида p199 в ростовую среду приводит к восстановлению сфероидообразования. Впервые на 3D культуре «стареющих» фибробластов выявлено уникальное свойство данного олигопептида – способность индуцировать экспрессию гена, ответственного за синтез важнейшего белка внеклеточного матрикса коллагена IV типа, которая утрачивается в процессе старения кожи. Это имеет фундаментальное значение в области исследования процессов старения и репарации. На модели повреждения клеточного монослоя показано, что добавление олигопептида p199 приводит к ускорению миграции клеток в область повреждения. Для анализа биологической активности изучаемого олигопептида впервые была применена 3D модель повреждения клеток с помощью микродиссекции наносекундным лазерным скальпелем, что позволило получить новые научные данные о стимулирующем влиянии олигопептида p199 на процессы регенерации клеточных сфероидов.

Теоретическая и практическая значимость

Практическая значимость заключается в том, что полученная в результате исследования 2D и 3D культура дермальных фибробластов человека может быть использована в качестве модели для проведения экспериментальных исследований *in vitro*. Впервые получены данные по индукции экспрессии коллагена IV типа в культуре «стареющих» фибробластов дермы человека под воздействием олигопептида p199, которые помогут для дальнейшего изучения возможности активации генов, находящихся в неактивном состоянии, и могут быть использованы в разработке новых методов лечения повреждений кожи и коррекции процессов старения. Впервые показано, что олигопептид p199

увеличивает экспрессию важнейших белков внеклеточного матрикса: цитокератина 19, эластина, фибронектина и PCNA. Данные о про-репарационных эффектах p199, приводящих к изменению синтеза белков внеклеточного матрикса и провоспалительных факторов, имеют теоретическое и практическое значение для исследований механизмов старения и безфиброзной репарации кожи.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертации Кожиной К.В. и сделанные на их основе выводы представляют собой фундамент для дальнейших исследований по изучению механизмов репарации после повреждения на модели стареющих фибробластов. Представленные автором 2D и 3D клеточные модели могут быть использованы для проведения фундаментальных исследований по изучению механизмов клеточного старения и процессов репарации кожи. Кроме того, полученные культуры дермальных фибробластов кожи человека могут быть рекомендованы для использования для оценки биологической активности, биобезопасности и цитотоксичности косметических препаратов. Полученные автором результаты демонстрируют, что исследуемый олигопептид p199 можно рекомендовать в качестве самостоятельного препарата для борьбы как с возрастными изменениями кожи, так и при ее повреждении.

Структура и содержание работы

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.

В главе «Введение» автор подтверждает актуальность данного исследования, кратко описывает проблему исследования процессов влияния олигопептидов на функциональную активность «стареющих» клеток и их репаративный потенциал. Также во «Введении» диссертант четко формулирует цель и задачи работы и дает обоснование ее научной новизны, теоретической и практической значимости. В разделе «Обзор литературы», включающем в себя пять глав, проводится анализ работ, посвященных исследованиям изменений процессов регенерации в коже, ассоциированных с возрастными изменениями, а также изучает вопрос существующих клеточных моделей для изучения функциональной активности клеток кожи и химических агентов, способных влиять на репаративный потенциал. В разделе «Материалы и методы» подробно описаны использованные протоколы 2D и 3D культивирования дермальных фибробластов человека, а также приведено описание комплекса таких сложных методов, как центрифужная микроскопия, иммуноцитохимический и молекулярный анализ, детально описан метод лазерной микродиссекции для нанесения повреждения 3D культурам клеток – сфероидам. Следует отметить, что набор использованных методик достаточен для решения поставленных задач. Раздел, в котором содержится описание собственных результатов и их обсуждение, подразделен на восемь подразделов, в первых двух из которых содержится анализ и характеристика культур «молодых» и «стареющих» дермальных фибробластов человека; во третьем подразделе автором описаны результаты подбора разведений олигопептида p199 для проведения дальнейших экспериментов; четвертый и пятый подразделы посвящены анализу влияния олигопептида p199 на синтез тканеспецифичных

маркеров – цитокератина 19, эластина, фибронектина, коллагенов I, III и IV типов, и миграционную активность «стареющих» дермальных фибробластов кожи человека в 2D культуре; в шестом разделе представлены результаты по изучению влияния олигопептида p199 на способность «стареющих» фибробластов формировать сфероиды и анализу синтеза в них тканеспецифичных маркеров; в седьмом и восьмом разделе представлены данные о динамике репарации сфероидов из дермальных фибробластов после нанесения повреждения с помощью наносекундного лазерного скальпеля и молекулярному анализу содержания в них провоспалительных факторов – простагландина E2 и циклооксигеназы 1. Результаты, представленные во всех восьми подразделах, логично обобщены, показана взаимосвязь между результатами, что позволило автору выстроить доказательную базу для сформулированной автором гипотезы. Полученные данные были проанализированы автором с помощью методов статического анализа. В каждой экспериментальной серии было проведено не менее трех повторностей, одновременно в каждой группе проанализировано не менее 200 клеток при анализе 2D культур и не менее 50 сфероидов при анализе 3D культур.

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертационной работе

Научные положения, выносимые на защиту Кожиной К.В., получены с использованием широкого набора современных иммуноцитохимических и молекулярных методов.

Результаты подтверждают основные положения, выносимые на защиту, и не вызывают сомнений в достоверности выявленного стимулирующего эффекта олигопептида p199 на функциональную активность и репаративный потенциал «стареющих» дермальных фибробластов кожи человека. Представленные в диссертационной работе

результаты опубликованы в 6 научных статьях (5 – в журналах из перечня, утвержденного ВАК РФ, и 1 – в научно-практическом журнале для врачей) и 3 публикации – в сборниках тезисных сообщений на международных конференциях. Сформулированные в диссертации выводы обоснованы, соответствуют поставленным задачам и полностью согласуются с результатами проведенных автором экспериментов. Принципиальных замечаний к работе нет.

Заключение

Диссертационная работа Кристины Витальевны Кожиной «Влияние олигопептида p199 на функциональную активность дермальных фибробластов кожи человека в эксперименте *in vitro*» является законченной, самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, посвященной актуальной теме и содержащей решение важной научной задачи по 3D моделированию и изучению изменений в функциональной активности и репаративном потенциале «стареющих» дермальных фибробластов кожи человека под влиянием синтетического олигопептида. Диссертационная работа соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а ее автор, Кожина Кристина Витальевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 – «Патологическая физиология».

Настоящий отзыв подготовлен профессором кафедры общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», доктором медицинских наук, профессором, заслуженным деятелем науки РФ, членом-корреспондентом РАЕН Дроздовой Галиной Александровной, обсужден и утвержден на заседании кафедры общей

патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова
Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы
народов», протокол № 9 от «12» апреля 2017 года.

Отзыв составили:

Профессор кафедры общей патологии
и патологической физиологии имени В.А. Фролова
Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский
университет дружбы народов»
доктор медицинских наук (14.00.16), профессор,
заслуженный деятель науки РФ,
член-корреспондент РАЕН

Г.А. Дроздова

Заведующий кафедрой общей патологии
и патологической физиологии имени В.А. Фролова
Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский
университет дружбы народов»
доктор медицинских наук (14.03.03), доцент

М.Л. Благодравов

Директор Медицинского института
ФГАОУ ВО «Российский университет
дружбы народов»
доктор медицинских наук



А.Ю. Абрамов

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Российский университет дружбы народов»
117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.
Тел. (495) 787-38-03, (495) 434-42-12, (495) 434-66-82
e-mail: rector@rudn.ru; rudn@rudn.ru

Отзыв ведущей организации о значимости диссертационной работы
Кожиной Кристины Витальевны «Влияние олигопептида p199 на
функциональную активность дермальных фибробластов кожи человека в
эксперименте *in vitro*», представленной к защите на соискание ученой
степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 –
патологическая физиология.