

ОТЗЫВ

официального оппонента, руководителя Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем Федерального Государственного Автономного Учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, доктора медицинских наук, профессора Борзенка Сергея Анатольевича на диссертацию Джуссоевой Екатерины Витальевны «Изучение функциональной активности меланоцитов, культивированных *in vitro* в 2D и 3D условиях», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 – «Патологическая физиология»

Актуальность темы выполненной работы

Диссертация Джуссоевой Е.В. посвящена весьма важной теме изучения функциональной активности меланоцитов кожи человека и возможности коррекции процесса меланогенеза на разных уровнях. Актуальность данного диссертационного исследования обусловлено увеличением роста заболеваний, связанных с нарушением пигментации, ряд которых может приводить к развитию онкологических заболеваний, таких как меланома, базально и плоскоклеточный рак кожи. Это диктует на мировой научной и клинической арене поиск и появление радикально новых методов и средств, которые позволят получить не только современные фундаментальные данные о меланогенезе, но и помогут скорректировать нарушения пигментации, сохранить качество жизни пациентов и разработать уникальные препараты для борьбы со злокачественными новообразованиями. Все это подчеркивает важность проведенного исследования для современного здравоохранения России.

Рост патологий, обусловленных нарушением процессов меланогенеза, связанный с этим поиск новых лекарственных препаратов, а также средств, направленных на профилактику явлений дисхромий, требуют глубокого понимания процессов нормальной и патологической активности клеток, а также поиска новых моделей исследования клеток *in vitro*. Ранее для исследований широко использовалась монослойная «2D культура» клеток, метод удобный и доступный в применении, однако имеющий ряд недостатков, таких как потеря ряда функциональных характеристик, изменение фенотипа клеток и т.д. На современном этапе 3D культура клеток рассматривается как более перспективный метод, позволяющий имитировать структуру микроткани *in vitro* и получать значительно больше информации о функциональной активности клеток. Поэтому проведенное Екатериной Витальевной исследование по изучению и сравнительному анализу функциональной активности меланоцитов, культивированных в 2D и 3D условиях, созданию модели для исследования нормы и патологии функционирования меланоцитов, пригодной для оценки эффективности лечебных или профилактических препаратов является актуальным, научно и практически значимым.

Представленное исследование является чрезвычайно важным, целесообразным и своевременным, так как поможет решить не только проблему нарушения меланогенеза и образования дисхромии, но и открывает новые пути выработки стратегии восстановительной и корректирующей медицины будущего.

Достоверность и новизна результатов

Для своей работы автор использовал культуру нормальных меланоцитов кожи человека. Исследование характеристик клеток, культивированных в монослое, позволило автору показать, что уже к 4 пассажу клетки по своим характеристикам имеют признаки репликационного старения клеток. Автором

впервые отработана воспроизводимая методика культивирования меланоцитов кожи человека в 3D условиях, позволяющая получать плотные сфероиды из меланоцитов. Выращивание клеток в виде сфероидов представляет уникальную клеточную модель, позволяющую проводить анализ функциональной активности клеток в условиях «микроткани».

Впервые автором был проведен сравнительный анализ экспрессии специфических генов тирозиназы и рецептора 1 к меланокортину, а также сравнительный анализ продукции транскрипционных факторов меланогенеза (gp100, MITF, Sox10) в составе тканевых эквивалентов Меланодерм и в меланосферах, что позволило получить новые фундаментальные данные о влиянии условий культивирования на функциональную активность клеток.

Проведенный иммуноцитохимический анализ экспрессии транскрипционных факторов меланогенеза gp100, MITF, Sox10, а также анализ экспрессии генов тирозиназы (TYR) и рецептора 1 к меланокортину (MC1R) методом ПЦР в реальном времени, позволил автору получить новые данные об ингибирующем эффекте препарата фукоксантин на функциональную активность меланоцитов (в условиях 2D и 3D культуры), подавляющее действие которого проявлялась не только на уровне синтеза ключевых белков, но и на уровне активности ключевых генов. Впервые именно на модели 3D культуры клеток показано, что фукоксантин подавляет экспрессию фактора регуляции созревания меланосом (gp100).

Автором исследования впервые получены данные о сохранении жизнеспособности и функциональной активности пигмент-продуцирующих клеток, культивированных в сфероидах, в течение длительного времени, что отличает модель клеток в сфероидах и позволяет автору утверждать о преимуществах данной модели культивирования клеток перед монослойной культурой или в составе тканевого эквивалента. Приведенные результаты позволяют утверждать, что поведение клеток в сфероидах близко к нативной ткани.

Высокое качество экспериментального материала, широкий спектр используемых методов исследования, статистический анализ полученных данных и подтверждение основных выводов в независимых повторах не вызывают сомнений в их достоверности. Результаты работы представлены автором на международных конференциях, материалы которых опубликованы и приведены в списке публикаций по теме диссертации.

Общая структура и содержание диссертационной работы

Диссертация Е.В. Джуссоевой представлена на 112 страницах машинописного текста. В работе 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 39 рисунков и 1 таблицу. В списке цитируемой литературы приведен 131 источник, из которых 14 российские и 117 зарубежные, из них 53 источника за последние 5 лет.

В разделе «Введение» сформулированы актуальность, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология исследования, положения, выносимые на защиту и личный вклад автора.

Глава «Обзор литературы» занимает 31 страницу и дает возможность ознакомиться с современным состоянием проблемы функционирования пигмент-продуцирующих клеток кожи человека в норме и патологии. В обзоре литературы дана общая характеристика рассматриваемой в работе проблемы, приводится детальное описание имеющихся на сегодня подходов к изучению функциональной активности меланоцитов на различных моделях, а также их ключевые недостатки, требующие дальнейшего изучения. Хорошо и с глубоким анализом литературы представлены разделы по современному представлению источников клеток-предшественников меланоцитов в

эмбриогенезе и взрослом организме, а также представлены данные по современному представлению процесса меланогенеза в клетках. Проведен анализ природных препаратов, влияющих на пигментацию кожи в норме и при патологии.

В главе «Материалы и методы» представлены данные об источниках получения меланоцитов, достаточно четко изложены использованные в работе современные методы культивирования клеток в 2D и 3D условиях, анализа жизнеспособности и контроля функциональной активности клеток на уровне экспрессии специфических маркеров меланогенеза, продукции пигмента, а также активности генов.

Глава «Результаты и обсуждения» посвящена подробному изложению полученных в работе научных результатов, материал логически структурирован для лучшего восприятия читателем. Результаты исследования наглядно проиллюстрированы на 38 рисунках и в 1 таблице. Обсуждение результатов проведено логично и с анализом полученных результатов с данными современной литературы.

Выводы исследования закономерно вытекают из анализа полученных результатов, обоснованы и полностью соответствуют поставленным задачам. Диссертация построена по традиционному типу, изложена хорошим научным языком. Содержание работы соответствует специальностям 14.03.03 - патологическая физиология.

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

Достоверность выводов и положений, выносимых на защиту, обеспечена применением комплексного подхода к исследованию с использованием современных методов, обширного экспериментального материала и его качественного и количественного анализа.

В исследовании показано, что при культивировании меланоцитов в монослое происходят значительные изменения характеристик клеток с ростом числа пассажей. Изменение морфологии высокодифференцированных меланоцитов, а также снижение пигмент продуктивной активности и скорости роста клеток с увеличением числа пассажей *in vitro*, свидетельствуют о процессах раннего «старения» клеток в монослойной культуре

Результаты исследования по монослойному культивированию клеток в присутствии разных концентраций растительного препарата фукоксантина наглядно показали, что препарат в высоких концентрациях цитотоксичен – тормозит пролиферацию (50 μ M) и даже вызывает гибель клеток (250 μ M). При использовании невысокой концентрации фукоксантина (5 μ M) пролиферативная активность меланоцитов достоверно не отличалась от контроля.

Используя разные концентрации фукоксантина с повторами экспериментов, автору удалось выявить зависимость ингибирующего эффекта от количества вещества на пролиферативную активность и пигмент продуцирующую активность исследуемых клеток. Результаты сравнительного анализа экспрессии ключевых факторов меланогенеза (MITF, Sox10) в опыте и контроле наглядно демонстрируют снижение экспрессии этих факторов при воздействии фукоксантином. Проведенный анализ экспрессии генов MC1R и TYR меланоцитами в составе тканевого эквивалента Меланодерм в контроле и в опыте с добавлением фукоксантина показал, что пигмент влияет на процесс меланогенеза не только на уровне ключевых факторов транскрипции, но и на генном уровне.

С помощью иммуноцитохимического анализа, автором было убедительно показано, что в отличии от данных, полученных на модели культивирования меланоцитов в составе тканевого эквивалента Меланодерм, при культивировании меланосфер наблюдалось достоверно снижению экспрессии всех трех транскрипционных факторов меланогенеза (gp100, MITF, Sox10), что свидетельствует о снижении готовности к меланогенезу и

формированию зрелых меланосом. Полученные данные свидетельствуют о том, что 3D культура меланоцитов в виде сфероидов является более чувствительной моделью, отражающей изменение функциональной активности клеток при добавлении ингибирующего фактора, что может быть использовано для контроля токсичности и эффективности косметических и лечебных препаратов, влияющих на регуляцию нормальной или патологической пигментации кожи.

Таким образом, приведенные автором научные положения, выводы и рекомендации являются абсолютно обоснованными. Полученные автором основные научные результаты представительны и достоверны. Использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны. Выводы диссертационной работы полностью обоснованы и соответствуют полученным результатам. Основные результаты диссертационного исследования отражены в публикациях.

Ценность для науки и практики результатов работы

В целом полученные автором результаты проведенных исследований имеют высокую научную значимость, поскольку дают новые фундаментальные знания по процессу меланогенеза в клетках, выращенных в разных условиях *in vitro*.

Выявленные автором закономерности влияния условий культивирования меланоцитов кожи человека на их функциональную активность позволяют утверждать, что полученные 2D и 3D клеточные модели могут быть использованы для проведения фундаментальных исследований по изучению механизмов клеточного старения и процессов нормальной или нарушенной пигментации кожи. Модель 3D культуры меланоцитов кожи человека в виде сфероидов может быть рекомендована для использования при контроле биологической активности, биобезопасности и цитотоксичности лекарственных или профилактических препаратов, влияющих на меланогенез.

Доказательно представленные данные по изменению ключевых факторов меланогенеза в пигмент-продуцирующих клетках кожи человека станут основой для разработки новых высокоэффективных препаратов для профилактики и терапии заболеваний и коррекции возрастных изменений, связанных с нарушением пигментации, а дерматологам и косметологам разработать продукты, позволяющие снизить риск развития рака кожи.

Результаты исследований растительного препарата фукоксантин показали его ингибирующее воздействие на продукцию пигмента в клетках на уровне транскрипционных факторов меланогенеза, что позволяет рекомендовать его в качестве высокоэффективного, влияющего на процессы меланогенеза средства для коррекции или лечения патологических изменений пигментации кожи человека.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

Полученные автором данные опубликованы в 9 печатных работах, включая 4 статьи, в том числе 3 работы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, 1 статья в рецензируемом журнале, входящем в список Web of Science, и 4 тезисов докладов на международных конференциях; 1 Российский патент.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

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

Замечания

Замечаний принципиального характера по представленной к защите диссертационной работе нет. Однако, в качестве дискуссионного представляется интересным задать вопрос: В процессе 2D и 3D культивирования меланоцитов имела ли достоверная разница в содержании меланосом, была ли отмечена депигментация меланосом в условиях культивирования 2D и на каких пассажах она возникала?

Заключение

Диссертация Джуссоевой Екатерины Витальевны «Изучение функциональной активности меланоцитов, культивированных *in vitro* в 2D и 3D условиях», 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 полученных автором материалах и результатах, их обработке и интерпретации. Оформление работы отвечает всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Исследование Джуссоевой Е.В. посвящено актуальной и важной проблеме для современного общества, проведено с использованием обширного набора современных методов, содержит уникальные результаты, исходя из которых, автор формулирует выводы и 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., №1168 от 01.10.2018 г.), а ее автор, Екатерина Витальевна Джуссоева, заслуживает

искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 -
Патологическая физиология.

Руководитель Центра фундаментальных и
прикладных медико-биологических проблем
Федерального Государственного Автономного
Учреждения «Национальный медицинский
исследовательский центр «Межотраслевой научно-
технический комплекс «Микрохирургии глаза» им.
акад. С.Н. Федорова» Минздрава России,
Доктор медицинских наук, профессор

Борзенок С.А.

Борзенок Сергей Анатольевич: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар,
дом 59а.

E-mail: mdborzenok@yandex.ru

Тел: +7 (925) 882-55-08

Подпись доктора медицинских наук, профессора Борзенка С.А.

заверяю,

Ученый секретарь ФГАУ «НМИЦ «МНТК
«Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова»
Минздрава России,
доктор медицинских наук

01.09.2010



Е.Э. Иойлева