

ОТЗЫВ

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

Меланогенез является уникальным процессом приспособления организма к окружающей среде. Непрерывное развитие медицины и технологий индуцирует поиск новых методов и средств, направленных на изучение нарушений пигментации, что обуславливает актуальность данного исследования. Нарушение пигментации нередко является одним из первых симптомов ряда соматических и эндокринных заболеваний, которое способно на протяжении длительного времени доминировать в их симптоматологии. При этом нарушение пигментации и, как следствие этого, неадекватная реакция кожи на ультрафиолетовую радиацию играют роль в этиологии злокачественных заболеваний. Пигментация кожи является результатом взаимодействия ряда клеток, лидирующую позицию среди которых занимают меланоциты, кератиноциты и фибробласты. Нарушение их взаимодействия, вызванное внешними и внутренними факторами, может привести к развитию патологических процессов в организме.

В настоящее время требуются более совершенные и высокочувствительные модели, которые возможно использовать для анализа

механизмов воздействия различных препаратов на пигмент-продуцирующие клетки. Изучение условий культивирования меланоцитов кожи человека в 2D и 3D условиях, способных отразить функциональную активность клеток, представляется актуальным для понимания нормы и патологии меланогенеза, а также целесообразным для выбора модели культуры клеток, пригодной в качестве тест-системы для контроля эффективности и безопасности препаратов. Представленное исследование является важным и своевременным, так как может решить проблему нарушения пигментации, открывая путь разработке стратегии диагностики, лечения и профилактики целого ряда патологий.

Достоверность и новизна результатов

Все исследования в представленной работе были проведены достаточное количество повторов, в контролируемых и стандартных условиях *in vitro* с проведением статистического анализа полученных данных, что может свидетельствовать о высокой степени достоверности полученных результатов.

Для анализа функциональной активности меланоцитов автор в диссертационной работе применяет монослойную 2D культуру клеток, культуру меланоцитов в составе тканевого эквивалента Меланодерм, а также впервые отработывает уникальный метод культивирования меланоцитов кожи человека в 3D сфероидах. При этом впервые наглядно показывает повышение пигмент-продуцирующей активности меланоцитов в меланосферах по сравнению с таковой в тканевых эквивалентах.

Весьма удачный эксперимент с добавлением препарата фукоксантина позволил получить новые данные об его ингибирующем действии на пигмент-продуцирующую активность клеток не только на уровне синтеза ключевых белков, но и на уровне активности генов по экспрессии специфических генов тирозиназы (*TYR*) и рецептора меланокортина-1 (*MCR1*). Согласно данным иммуноцитохимического анализа впервые

показано, что в 3D культуре фукоксантин подавляет экспрессию фактора регуляции созревания меланосом gp100, что не отражалось в монослойной (2D) культуре. Это позволяет утверждать, что фукоксантин может применяться в качестве средства, способного влиять на процессы меланогенеза в рамках коррекции, лечения и профилактики патологической пигментации.

Автор сравнивает исследуемые модели культур меланоцитов, выращенных в разных 2D и 3D условиях, и подтверждает результатами научного исследования, что 3D культура в виде сфероидов является наиболее перспективной моделью для изучения изменений функционального потенциала клеток.

Представленные в диссертационной работе результаты экспериментальных исследований написаны четко, хорошо иллюстрированы, данные являются достоверными и оригинальными, не вызывая сомнений.

Общая структура и содержание диссертационной работы

Диссертация написана по общепринятому плану, логично построена, изложена на 112 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 39 рисунков и 1 таблицу. В списке цитируемой литературы приведен 131 источник, из которых 14 написаны на русском языке и 117 - на английском.

Во введении четко сформулированы актуальность исследования, его цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость. Эта часть диссертации дает ясное представление об изучаемой проблеме и существенно облегчает восприятие дальнейшего материала.

Обзор литературы изложен на 31 странице машинописного текста, органично разбит на главы, написан хорошим научным языком. Автором

рассмотрены источники клеток-предшественников меланоцитов, проанализирован вклад эндогенных и экзогенных факторов в развитие возрастных изменений, описаны механизмы, ответственные за процесс меланогенеза в норме и при патологии. В обзоре освещено современное состояние проблемы получения, культивирования клеток человека и животных и использования их для получения биологически активных препаратов, а также в качестве моделей для проведения фундаментальных исследований *in vitro* и изучения эффективности лекарственных средств. В обзоре детально рассмотрено современное представление условий 2D и 3D культивирования клеток. Анализ литературы подчеркивает актуальность и своевременность проведения диссертационного исследования. Таким образом, обзор литературы дает детальное представление о современном состоянии научной проблемы, в достаточной степени проиллюстрирован, материал преподносится последовательно и грамотно.

В главе «Материалы, и методы» представлены данные о культуре меланоцитов, подробно описаны методы культивирования меланоцитов в 2D и 3D условиях и анализа функциональной активности меланоцитов кожи человека с использованием целого комплекса методов: цейтраферной микроскопии, морфометрического анализа, гистологии, флуоресцентного и иммуноцитохимического, а также молекулярно-биологического анализа. Все протоколы четко и грамотно изложены, используемые автором методы соответствуют поставленным задачам и достаточны для их решения.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из четырех разделов, которые хорошо структурированы и логически связаны. В первом разделе автор дает подробное описание и характеристику монослойной (2D) культуры меланоцитов кожи человека. Анализируя изменение культуральных и морфологических характеристик культуры меланоцитов, автор показывает функциональные различия между культурой клеток на 3 и 4 пассаже, отражая снижение пролиферативной активности, изменения в морфологии клеток и характере формирования монослоя. Во втором разделе

автор описывает особенности роста меланоцитов и их пигмент-продуцирующую активность в тканевом эквиваленте Меланодерм в контроле и при добавлении фукоксантина. В третьем разделе результатов автор детально описывает условия формирования сфероидов из меланоцитов кожи человека в 3D культуре с последующим исследованием динамики накопления в них пигмента в контроле и присутствии препарата. В четвертом разделе автор проводит весьма убедительный сравнительный анализ результатов исследований на моделях тканевого эквивалента Меланодерм и меланосфер с добавлением препарата и в контроле, противопоставляя простоту использования 2D культуры более высокой чувствительности 3D модели.

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

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

В каждом разделе автор детально описывает и подробно обсуждает полученные результаты, подтверждает их данными в виде рисунков и графиков, заканчивая каждый раздел небольшим заключением.

С использованием разных концентраций фукоксантина автор показал цитотоксичность препарата и определил концентрации, не вызывающие значительных изменений клеток. Показано, что фукоксантин в невысоких концентрациях не только тормозит рост меланоцитов, но и снижает их активность по продукции и накоплению меланина. Результаты сравнительного анализа экспрессии ключевых факторов меланогенеза (gp100, MITF, Sox10) в опыте и контроле наглядно демонстрируют снижение экспрессии этих факторов при воздействии фукоксантина. Автор показал, что при культивировании сфероидов в присутствии фукоксантина наблюдается достоверное снижение всех трех транскрипционных факторов

меланогенеза (gp100, MIF, Sox10). Кроме того, снижение gp100 свидетельствует о влиянии препарата даже в низкой концентрации не только на функциональную активность, но и в целом снижает готовность к меланогенезу. Проведенный анализ экспрессии генов MC1R и TYR меланоцитами в составе тканевого эквивалента Меланодерм в контроле и опыте с добавлением фукоксантина показал, что пигмент влияет на процесс меланогенеза не только на уровне ключевых факторов транскрипции, но и на генном уровне.

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

Ценность для науки и практики результатов работы

Диссертационное исследование Екатерины Витальевны Джуссоевой несомненно представляет теоретический и практический интерес для биомедицинских наук и расширяет представление о применении клеточных моделей для исследований в области патологической физиологии и медицины в целом. 2D и 3D клеточные модели меланоцитов могут быть использованы для проведения фундаментальных исследований, а также для тестирования различных препаратов, направленных на лечение и профилактику дисхромий, а также как модель исследования внутриклеточных процессов в норме и патологии.

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 пигментации кожи, а также для проведения скрининга лекарственных препаратов.

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. Публикации соответствуют содержанию экспериментальной части работы.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

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

Замечания

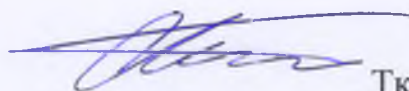
Принципиальных замечаний по выполненной диссертации нет, можно лишь отметить отдельные редакционные недоработки.

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 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, Екатерина Витальевна

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

Заведующий кафедрой клинической физиологии
и функциональной диагностики
ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия
непрерывного профессионального
образования» Минздрава России,
доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

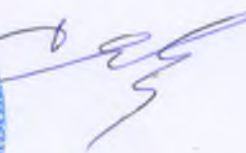


Ткаченко С.Б.

Ткаченко Сергей Борисович: 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр.1.
E-mail: Doc4200@vandex.ru
Тел.: 8(985)999-54-91

Подпись член-корр. РАН, профессора Ткаченко С.Б. заверяю,
Ученый секретарь ФГБОУ ДПО РМАНПО
Минздрава РФ, профессор

31.08.2020



Савченко Л.М.