

УТВЕРЖДАЮ:

Директор
Автономной научной
некоммерческой организации
высшего образования научно-
исследовательский центр
"Санкт-Петербургский институт
биорегуляции и геронтологии
з.д.н. РФ, член-корр. РАН,
доктор медицинских наук,
профессор



В.Х. Хавинсон

«8» сентября 2017г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Автономной научной некоммерческой организации высшего образования научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»

Диссертация «Влияние пептидов эпифиза на фибробласты кожи при старении» выполнена в лаборатории молекулярных механизмов старения отдела биogerонтологии АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии».

В период подготовки диссертации и по настоящее время соискатель Орлова Оксана Анатольевна работает в АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» в лаборатории молекулярных механизмов старения научным сотрудником. В 1995 году О.А. Орлова окончила Алматинский государственный медицинский институт, г. Алматы по специальности «Педиатрия». В 2003 году прошла полный курс подготовки в клинической ординатуре Алматинского государственного института усовершенствования врачей по специальности «Педиатрия», а в 2012 году прошла профессиональную переподготовку в СЗГМУ им. И.И. Мечникова по программе «Косметология».

О.А. Орлова является соискателем АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» без окончания аспирантуры. Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в 2016 г. в ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» МЗ РФ. Научный руководитель – доктор биологических наук Линькова Наталья Сергеевна - работает руководителем лаборатории молекулярных механизмов старения АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» по совместительству.

По итогам обсуждения диссертации Орловой Оксаны Анатольевны «Влияние пептидов эпифиза на фибробласты кожи при старении» принято следующее заключение:

Представленная диссертационная работа Орловой Оксаны Анатольевны состоит из введения, обзора литературы, описания результатов собственных исследований, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 115 страницах и иллюстрирован 22 рисунками. Список литературы содержит 193 источника, из них на русском языке – 58, на английском – 135.

Диссертационная работа Орловой О.А. выполнена на высоком научном уровне с использованием современных экспериментальных методов.

Все результаты, представленные в диссертации, получены при непосредственном участии автора. **Личный вклад автора** состоял в составлении плана работы, проведении опытов, статистической обработке и анализе данных сравнительного молекулярного механизма действия пептида AEDG и полипептидного комплекса эпифиза (ППЭ) в культурах фибробластов кожи при их старении. Автор принимала участие во всех экспериментах, включавших в себя культивирование клеток, иммуноцитохимическое окрашивание, микроскопию, морфометрию и статистический анализ данных. Кроме того, автор работы принимала участие в написании тезисов, статей и глав в монографиях по результатам проведенных исследований, неоднократно участвовала с устными докладами на российских и международных конференциях по проблемам геронтологии и косметологии.

Актуальность. В последние годы большое число исследований посвящено изучению старения организма. Прогрессирующее увеличение доли лиц пожилого и старческого возраста в общей численности населения становится актуальной медицинской, социальной и экономической проблемой. Средняя продолжительность жизни людей за последние 20 лет в России увеличилась на 10%, а в Европе - на 15%. Первые признаки старения отмечаются в коже, выполняющей, прежде всего, барьерную функцию и наиболее подверженной неблагоприятному воздействию внешней среды. Инволютивные изменения в коже характеризуются дисфункцией защитного барьера. Кроме того, старение кожи имеет выраженные внешние проявления и способствует возникновению неблагоприятного эстетического восприятия, что особенно важно для людей, работа которых связана с активной социальной жизнью. Таким образом, старение кожи имеет функционально-физиологическое и социальное значение, что обуславливает актуальность данной проблемы.

На клеточном уровне старение кожи и других органов и тканей проявляется в нарушении синтеза ряда сигнальных молекул, белков и пептидов. Темп возрастной инволюции кожи определяется изменением соотношения вступивших в апоптоз и пролиферацию клеток, что, в свою очередь, связано с балансом экспрессии про- и антиапоптотических белков.

Согласно современным представлениям, обновление клеточного состава кожи осуществляется за счет постоянно протекающих процессов пролиферации и дифференцировки полипотентных клеток, расположенных на базальной мембране эпидермиса и на волосяных фолликулах. Полипотентные клетки базального эпидермиса поддерживают пул кератиноцитов, клетки волосяного фолликула способны дифференцироваться в кератиноциты и в различные типы клеток дермы. Для активации и регуляции процессов клеточного обновления необходим каскад физиологических реакций, реализуемый цитокинами, факторами роста и другими сигнальными молекулами, синтез которых регулируется микроокружением и непосредственно фибробластами кожи. Вследствие возрастного снижения функциональной активности клеток кожи количество синтезируемых в ней сигнальных молекул и эндогенных пептидов становится недостаточным для пролиферации и дифференцировки фибробластов кожи. То есть при старении на клеточном и субклеточном уровне организации наблюдается нарушение синтеза пептидов. Кроме того, возрастная инволюция организма связана с потерей чувствительности к пептидам клеток-мишеней в различных органах и тканях.

Поиск новых эффективных и безопасных низкомолекулярных веществ, стимулирующих процессы регенерации кожи, является актуальной задачей геронтокосметологии. Регуляция репаративных процессов в тканях организма может осуществляться короткими пептидами. Применение коротких пептидов является одной из инноваций в медицине и позволяет существенно замедлить темпы старения за счет стимуляции пролиферации и регенерации тканей.

По данным ранее проведенных экспериментов в культурах клеток и на животных пептид AEDG обладает антиоксидантной активностью, регулирует синтез мелатонина, обладает иммуностимулирующими свойствами, снижает риск развития опухолевых заболеваний, регулирует функциональную активность нейроиммуноэндокринной системы, способствует увеличению длины теломер в нормальных фибробластах и преодолению лимита Хейфлика. Применение пептида AEDG у животных приводило к замедлению процессов старения, снижению темпов развития возрастной патологии и увеличению продолжительности жизни. На органотипических культурах клеток кожи крыс разного возраста было показано, что пептид AEDG стимулирует рост эксплантатов.

ППЭ выделен из эпифиза головного мозга телят, и является эффективным средством в лечении гормонозависимых опухолей, дисгормональной миокардиодистрофии, последствий стрессорных воздействий на организм, восстанавливает гистологическую структуру селезенки после эпифизэктомии и способствуют нормализации ее иммунной функции. ППЭ в экспериментах способствовал достоверному увеличению средней и максимальной продолжительности жизни мышей и крыс,

замедлению у них старения репродуктивной системы, повышению двигательной активности и физической выносливости.

Таким образом, физиологическая стимуляция пептидами может способствовать восстановлению функционирования кожи на молекулярно-клеточном уровне. В основе молекулярного механизма действия коротких пептидов лежит их способность эпигенетически регулировать экспрессию генов, синтез белков и активировать пролиферацию и дифференцировку клеток. Использование коротких пептидов в эстетической медицине с целью профилактики возрастных изменений организма может способствовать торможению дегенеративных изменений в коже.

Научная новизна. При изучении кривой клеточного роста фибробластов кожи впервые установлено, что эффективная концентрация для пептида AEDG составляет 100 нг/мл, а для ППЭ - 1000 нг/мл. В работе впервые проведено сравнительное изучение влияния пептида AEDG и ППЭ на экспрессию сигнальных молекул (p53, p16, Caspase-3, Sirtuin-6, CD98hc, MMP9, Ki67) в культурах фибробластов кожи при их старении пассажами. Установлено, что пептид AEDG и ППЭ снижают уровень апоптоза в фибробластах кожи при их старении, оцениваемый по экспрессии белков p53, p16. При этом ППЭ оказывает более выраженное действие в «молодых» и «старых» культурах клеток кожи.

Впервые показано, что пептид AEDG повышает экспрессию белка репарации Sirtuin-6 в «молодых» культурах, а ППЭ стимулирует экспрессию Sirtuin-6 в «старых» культурах фибробластов кожи. Пептид AEDG и ППЭ повышают экспрессию гликопротеина CD98hc в «старых» культурах, не влияя на этот показатель в «молодых» культурах клеток кожи. ППЭ стимулирует снижающуюся при клеточном старении экспрессию транскрипционного фактора Ki67 в «молодых» и «старых» культурах фибробластов, причём его эффект более выражен, чем у пептида AEDG.

Впервые показано, что пептид AEDG повышает экспрессию белка MMP9, вовлеченного в ремоделирование межклеточного матрикса, в «молодых» и «старых» фибробластах кожи.

Практическая значимость. Полученные результаты позволили провести сравнительный анализ молекулярных механизмов биологической активности пептида AEDG и ППЭ в отношении пула сигнальных молекул – маркеров обновления и процессов клеточного старения - p53, p16, Caspase-3, Sirtuin-6, CD98hc, MMP9, Ki67. Полученные данные свидетельствуют о том, что использование пептида AEDG и ППЭ может являться эффективным методом повышения функциональной активности фибробластов кожи.

Достоверность полученных результатов подтверждается корректной, общепринятой статистической обработкой результатов экспериментальных измерений, а также положительными результатами практического использования данных, представленных в настоящем диссертационном исследовании.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

По материалам диссертации опубликовано 30 работ: 4 статьи в журналах по перечню ВАК, 4 главы в монографиях, 4 статьи в других журналах, 18 тезисов докладов. Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Транскрипционный фактор p53 и старение кожи/ Гриценко Д.А., Орлова О.А., Линькова Н.С. и соавт.// Успехи геронтологии. – 2017. – Т.30, №1. – С. 10-16.
2. Пептидная регуляция функций фибробластов кожи при их старении *in vitro*/ Линькова Н.С., Дробинцева А.О., Орлова О.А. и соавт.// Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. - №1. – С. 40-44.
3. Молекулярные механизмы снижения функциональной активности клеток кожи при ее старении / Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Куканова Е.О., Орлова О.А. / Успехи физиологических наук. – 2016. – Т. 47, № 2.- С. 62-76.
4. Короткие пептиды стимулируют клеточную регенерацию в коже при старении/ Чалисова Н.И., Линькова Н.С., Жекалов А.Н., Орлова А.О. и соавт.// Успехи геронтологии. – 2014. – Т.27, №4. – С. 699-703.

Апробация работы. Результаты диссертационного исследования доложены на Международном форуме «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2014, 2017); конференции «Актуальные аспекты геронтологии и гериатрии: от теории к практике» (Киев, 2014); конференции «Пожилой больной. Качество жизни» (Москва, 2014); конференции «Пушковские чтения» (Санкт-Петербург, 2014); 13th Aesthetic & Anti-aging Medicine World Congress “Euromedicom” (Monako, Spain, 2015); республиканской международной конференции с международным участием «Организация оказания медицинской помощи лицам пожилого и старческого возраста» (Уфа, 2016); научно-практической конференции с международным участием «Проблемы возрастной патологии в Арктическом регионе: биологические, клинические и социальные аспекты» (Якутск, 2016); Сочинской третьей международной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии» (Сочи, 2016); V European Congress of Preventive, Regenerative and Anti-Aging Medicine (Санкт-Петербург, 2016); International symposium Expert’s opinion on current approaches in anti-ageing medicine and gerontology (Geneva, Switzerland, 2017); VI Ежегодной международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицины» (Азербайджан, Баку, 2017); Aesthetic & Anti-aging Medicine World Congress (Monako, Spain, 2017).

Соответствие диссертации специальности.

По актуальности, новизне, научной и практической значимости, объему исследований, глубине анализа и обобщения материала диссертационная работа Орловой Оксаны Анатольевны полностью соответствует требованиям п. 9 и п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней...», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от

24.09.2013 г. № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04. 2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия.

Диссертация «Влияние пептидов эпифиза на фибробласты кожи при старении» Орловой Оксаны Анатольевны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия.

Заключение принято на заседании Проблемной комиссии АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии». Присутствовало на заседании - 11 чел. Результаты голосования: «за» - 11 чел., «против» - 0 чел., «воздержалось» - 0 чел., протокол №2 от «17» апреля 2017 г.

Председатель Проблемной комиссии
АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт
биорегуляции и геронтологии»
засл. деят. науки РФ, д.м.н., профессор



Г.А. Рыжак

Ответственный секретарь Проблемной комиссии
АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт
биорегуляции и геронтологии»
доктор биол. наук, профессор

Т.В. Кветная