

**Заключение экспертной комиссии диссертационного совета
Д 521.103.01 01 при Автономной научной некоммерческой организации
высшего образования Научно-исследовательский центр
«Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»
по диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук ФРИДМАН Натальи Владимировны
на тему: «Влияние пептидов на фибробласты кожи человека при
репликативном старении»**

Для рассмотрения работы Н.В. Фридман была создана комиссия из членов диссертационного совета в составе: з.д.н. РФ, д.м.н., проф. Г.А. Рыжак (председатель); д.б.н., проф. Т.В. Кветная; д.б.н. И.Г. Попович.

Комиссия ознакомилась с диссертацией и представленными документами.

Работа выполнена в лаборатории молекулярных механизмов старения отдела биogerонтологии Автономной научной некоммерческой организации высшего образования Научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» (АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии») при участии научного руководителя д.б.н., доцента Н.С. Линьковой и научного консультанта д.м.н., профессора С.В. Трофимовой.

Диссертация была апробирована 28 декабря 2020 г. протокол №6 на совместном заседании отделов биogerонтологии, клеточной биологии и патологии, клинической геронтологии и гериатрии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» и рекомендована к защите на Диссертационном совете Д 521.103.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальности 14.01.30 - геронтология и гериатрия.

Актуальность исследования. По данным Всемирной организации здравоохранения, в мире с каждым годом увеличивается число людей пожилого и старческого возраста. В Санкт-Петербурге с 1990 по 2005 г. доля населения старше трудоспособного возраста выросла на 14,5%. В Российской Федерации ожидается значительное увеличение численности населения в возрасте 60 лет и старше в предстоящее десятилетие: до 30,8 млн человек в 2025 г. и до 36,2 млн в 2050 г.

Частота обращений пациентов пожилого возраста к врачам растет. Не исключением является и обращение лиц старше 60 лет к дерматологам-косметологам, что еще 10–15 лет назад было редкостью. В настоящее время люди этой возрастной категории все чаще ведут активную социальную жизнь, востребованы на работе и в семье, занимаются спортом. Желание быть полноценными участниками событий современного общества закономерно приводит к стремлению вести здоровый образ жизни и привлекательно выглядеть. Результатом этого является визит к специалисту косметологического профиля. Правильный выбор процедуры с учетом

возрастных особенностей является залогом не только привлекательной внешности, но и улучшения качества жизни. Необходимость коррекции не только видимого старения кожи, но и патологических процессов, развивающихся в организме в целом, позволяет рассматривать кожу как часть стареющего организма.

Известно, что старение характеризуется накоплением макромолекулярных повреждений, нарушением обновления тканей и прогрессирующей потерей физиологической целостности. Одним из таких признаков является клеточное старение, которое активируется различными внутренними (укорочением теломер, избыточным производством активных форм кислорода) и внешними (УФ-излучение, недостаток питательных веществ, воспаление) стимулами, ведущими к остановке клеточного роста и специфическим фенотипическим изменениям. Выделяют естественное и ускоренное старение кожи, обусловленные соответственно внутренними и внешними стимулами. Как при естественном, так и при ускоренном старении кожи в патогенез этого процесса вовлечено большое количество различных клеточных и молекулярных факторов, основными из которых являются компоненты внеклеточного матрикса (коллаген, эластин, гликопротеины), транскрипционные факторы (p16, p53, p63, NF-κB), матриксные металлопротеиназы, цитокины, регуляторы окислительно-восстановительного баланса. Основным типом клеток, обеспечивающих метаболизм в коже, являются фибробласты. В них происходит синтез коллагена, выработка факторов роста, регуляция продукции провоспалительных цитокинов. При старении секреторный фенотип фибробластов изменяется, снижается способность синтезировать коллаген и эластин, что приводит к проявлению внешних признаков старения кожи. Таким образом, целесообразным является поиск веществ, способных осуществлять регуляцию физиологической активности фибробластов кожи и предотвращать их преждевременное старение.

В настоящее время в геронтокосметологии возрастает интерес к препаратам, содержащим в своем составе пептиды или их комплексы. Выделяют сигнальные пептиды, энзимные ингибиторы, нейротрансмиттерные ингибиторы и транспортные пептиды. Короткие ди- и трипептиды, разработанные в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии, обладают тканеспецифическим и иммуномодулирующим действием, благодаря чему их возможно применять при различных патологических процессах, в том числе при преждевременном старении кожи. Пептиды AED и KE демонстрировали пролиферативное (повышение синтеза белка Ki67) и антиапоптотическое (снижение синтеза каспазы-3) действие в культурах фибробластов кожи при репликативном старении. Добавление этих пептидов в культуру фибробластов кожи приводило к повышению их функциональной активности путем стимуляции экспрессии фактора CD98hc. Пептид KE обладает иммуномодулирующим действием, восстанавливая баланс про- и противовоспалительных цитокинов в моделях

in vitro и *in vivo*. Кроме того, *in silico* пептид KE демонстрирует высокую степень связывания с двуцепочечной ДНК, что позволяет предположить наличие эпигенетического механизма регуляции экспрессии генов короткими пептидами. В связи с наличием большого количества литературных данных, свидетельствующих о возможности пептидов AED и KE регулировать функциональную активность клеток, актуальным является изучение их влияния на репликативное старение фибробластов кожи человека.

Наиболее значимые результаты, полученные в работе. Площадь экспрессии SIRT1 в «старых» фибробластах кожи человека была в 1,8 раза ниже, чем в «молодых» культурах. Пептид AED повышал площади экспрессии SIRT1 в «молодых» культурах в 2,4 раза, а в «старых» культурах — в 2 раза. Пептид KE не влиял на экспрессию SIRT1 при репликативном старении фибробластов кожи человека. При клеточном старении экспрессия SIRT1 в фибробластах снижалась, что указывает на геропротекторные свойства пептида AED в отношении дермы. При репликативном старении фибробластов кожи человека площадь экспрессии SIRT6 уменьшалась в 3,6 раза. Пептид KE повышал площадь экспрессии SIRT6 в «молодых» культурах в 1,6 раза, а в «старых» культурах — в 2,6 раза. Пептид AED увеличивал площадь экспрессии SIRT6 в «молодых» фибробластах кожи в 1,7 раза, а в «старых» культурах — в 11,5 раза. Снижение экспрессии SIRT6 может приводить к нарушению экспрессии генов и репарации ДНК. Эффект пептидов указывает на их геропротекторные свойства. Площадь экспрессии MMP-1 в «старых» культурах фибробластов была в 2,5 раза выше, чем в «молодых» культурах. Пептид AED снижал площадь экспрессии MMP-1 в «молодых» культурах дермальных фибробластов в 2,2 раза и в «старых» культурах — в 1,6 раза. Площадь экспрессии коллагена I типа в «старых» культурах фибробластов кожи в 3,5 раза ниже, чем в «молодых» культурах. Пептид KE повышал площадь экспрессии коллагена I типа в 1,8 раза в «старых» культурах. Пептид AED увеличивал площадь экспрессии коллагена I типа в «молодых» и «старых» дермальных фибробластах соответственно в 2,3 и 2,7 раза. Пептид AED, снижая синтез MMP1, регулирует ремоделирование внеклеточного матрикса дермы, замедляя ее старение. При репликативном старении фибробластов кожи площадь экспрессии IL-1 повышается в 1,7 раза. Пептид KE снижает синтез провоспалительного цитокина IL-1 и транскрипционного фактора NF- κ B соответственно в 1,6 и 1,9 раза в «старых» фибробластах кожи человека. Пептид AED не влияет на синтез IL-1 и NF- κ B в дермальных фибробластах при их репликативном старении. Иммуномодулирующий пептид KE, регулирующий синтез IL-1, NF- κ B, может рассматриваться как вещество, предотвращающее развитие воспалительной реакции в дерме при ее старении. При репликативном старении фибробластов кожи человека площадь экспрессии TGF- β увеличивается в 4,8 раза. Пептид KE в 2 раза снижает синтез фактора роста TGF- β в «старых» дермальных фибробластах. Подавление синтеза фактора роста TGF- β под действием пептида KE может препятствовать

биодegradации коллагена в дерме при старении кожи. Площадь экспрессии СОХ-2 в фибробластах кожи человека при репликативном старении увеличивается в 4,8 раза. Пептиды АЕД и КЕ соответственно в 2 и 3 раза снижают синтез фермента СОХ-2 в «старых» фибробластах кожи человека. Эти данные указывают на антиоксидантное действие пептидов АЕД и КЕ. Пептиды АЕД и КЕ замедляют старение фибробластов кожи человека. В основе геропротекторного действия этих пептидов лежит их противовоспалительное, антиоксидантное действие, способность восстанавливать иммунную функцию дермы и ремоделирование межклеточного матрикса в ней при старении.

Достоверность работы обеспечена достаточным объемом экспериментальных исследований, применением адекватных поставленным задачам современных методов исследования (иммуоцитохимический метод, метод культивирования фибробластов кожи, морфометрические исследования, компьютерный анализ микроскопических изображений) и методов математико-статистической обработки полученных данных.

Новизна работы. При репликативном старении фибробластов кожи человека в них снижается экспрессия сиртуинов 1, 6, что свидетельствует о снижении активности системы репарации ДНК и антиоксидантной функции клеток. Показано, что при старении фибробластов кожи в них снижается синтез коллагена и повышает экспрессия матриксной металлопротеиназы-1, что является одним из ключевых факторов, способствующих визуальному проявлению старения этой ткани. Впервые установлено, что при старении фибробластов дермы человека в них повышается экспрессия фермента СОХ-2 и фактора роста TGF- β . Впервые показано, что при старении фибробластов кожи повышается синтез провоспалительных цитокинов IL-1 и NF- κ B, что согласуется с теорией развития inflamm-aging (ограниченного слабо выраженного воспалительного процесса). В работе впервые доказана способность пептидов АЕД и КЕ замедлять процесс репликативного старения дермальных фибробластов. Этот эффект достигается пептидной регуляцией синтеза цитокинов, транскрипционных факторов, факторов роста и регуляторов окислительно-восстановительного баланса. Установлено, что пептид КЕ предотвращает воспалительные процессы, возникающие при репликативном старении фибробластов кожи человека. Это выражается в снижении экспрессии цитокина IL-1 и транскрипционного фактора NF- κ B в фибробластах кожи при действии пептида КЕ. Установлено, что пептид АЕД активирует синтез коллагена I типа и ингибирует экспрессию MMP1. Впервые показано, что при репликативном старении фибробластов кожи человека пептиды КЕ и АЕД обладают антиоксидантным (регуляция синтеза фермента СОХ-2) и геропротекторным действием (регуляция синтеза сиртуинов 1 и 6).

Теоретическая значимость. На основе проведенного Н.В. Фридман исследования обосновано, что экспрессия ряда сигнальных молекул в фибробластах кожи изменяется при их репликативном старении, а короткие

геропротекторные пептиды AED, KE могут восстанавливать их экспрессию до уровня «молодых» клеток.

Практическая значимость. Исследование влияния пептидов AED и KE на репликативное старение дермальных фибробластов *in vitro* позволило установить, что изученные пептиды оказывают геропротекторное, противовоспалительное и антиоксидантное действие. Пептиды AED и KE регулируют синтез гистоновых деацетилаз SIRT1, 6, участвующих в репарации ДНК и влияющих на продолжительность жизни. Пептид AED снижает синтез фермента MMP1, способствующего гидролизу белков межклеточного матрикса, в том числе коллагена и эластина. Поскольку повышенное разрушение этих белков наблюдается при старении не только дермы, но и соединительной ткани, расположенной в других органах, это указывает на геропротекторный эффект пептида AED в отношении соединительной ткани. Антиоксидантное действие пептидов AED и KE, выражающееся в регуляции синтеза фермента COX-2, играет важную роль в поддержании функций дермы при ее естественном и стресс-индуцированном старении.

Результаты исследования используются в научно-исследовательской работе в АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» и ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН.

Рекомендации для дальнейшего использования результатов, полученных в работе. Рекомендовано дальнейшее исследование пептида AED в экспериментах *in vitro* и *in vivo* для стимуляции ремоделирования компонентов ВКМ и снижения выраженности внешних проявлений старения кожи. Иммуномодулирующий пептид KE может быть рекомендован к исследованию на животных для оценки снижения уровня экспрессии провоспалительных цитокинов в коже, наблюдаемое при ее старении. Рекомендовано сравнительное и совместное исследование пептидов AED и KE в экспериментах *in vitro* и *in vivo* в качестве антиоксидантных средств для восстановления оксидативного профиля кожи при ее старении.

Заключение. На основании вышеизложенного, диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук Фридман Натальи Владимировны на тему: «Влияние пептидов на фибробласты кожи человека при репликативном старении» может быть оценена как законченная самостоятельная научно-квалификационная работа, которая полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 01.10.2018 г. №1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, содержит решение актуальной для современной молекулярной и клинической геронтологии задачи: восстановления экспрессии сигнальных молекул – маркеров репликативного старения фибробластов кожи человека короткими геропротекторными пептидами AED, KE и может быть принята к

защите по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия (биологические науки).

В качестве официальных оппонентов предлагаются: Смирнова Ирина Олеговна - доктор медицинских наук, доцент, ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», кафедра инфекционных болезней, эпидемиологии и дерматовенерологии, профессор кафедры, 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7-9; Королькова Татьяна Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» МЗ РФ, заведующая кафедрой косметологии, 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д.41.

Предлагается направить работу Фридман Натальи Владимировны на тему: «Влияние пептидов на фибробласты кожи человека при репликативном старении» на отзыв Ведущего учреждения в Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Петрозаводский государственный университет», 185910, Россия, Республика Карелия, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33.

Предлагается список специалистов, которым необходимо направить автореферат в дополнение к основному списку рассылки:

1.	Федорец Виктор Николаевич доктор медицинских наук, доцент	Профессор кафедры факультетской терапии им. профессора В.А. Вальдмана, Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д.2
2.	Крылов Борис Владимирович, доктор биологических наук, профессор	Заведующий лаборатории возбудимых мембран, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6.
3.	Ильницкий Андрей Николаевич, доктор медицинских наук, профессор	Заведующий кафедрой терапии, гериатрии и антивозрастной медицины, Институт повышения квалификации ФМБА, 125371, Россия, Москва, Волоколамское шоссе, 91.
4.	Шишкин Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор	Заведующий кафедрой факультетской терапии, Санкт-Петербургский государственный университет,

		199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9.
5.	Булгакова Светлана Викторовна, доктор медицинских наук, доцент	Заведующая кафедрой гериатрии и возрастной эндокринологии, Самарский государственный медицинский университет, 443099, Россия, Самара, ул. Чапаевская, 89.
6.	Воробьев Константин Владимирович, доктор биологических наук	Профессор высшей школы биомедицинских систем и технологий института биомедицинских систем и технологий, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 11.

Предполагаемый срок защиты:

14 мая 2021 г

Председатель комиссии:

з.д.н. РФ, доктор медицинских наук,
профессор



Г.А. Рыжак

Члены комиссии:

доктор биологических наук,
профессор



Т.В. Кветная

доктор биологических наук



И.Г. Попович

24 февраля 2021 г.

Подписи з.д.н. РФ, д.м.н., проф. Г.А Рыжак, д.б.н., проф. Т.В. Кветной,
д.б.н. И.Г. Попович заверяю.

Начальник отдела кадров АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт
биорегуляции и геронтологии» М.В. Соколова

