

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Бутолина Евгения Германовича на диссертацию Сельской Бэлы Натановны на тему: «Метаболизм коллагена и гликозаминогликанов в коже экспериментальных животных при интрадермальном введении коллагенсодержащего инъекционного препарата», представленную к защите в Диссертационный совет Д 208.084.05 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.01.04. – Биохимия.

Актуальность избранной темы.

Исследование метаболических процессов в организме человека в процессе старения является актуальным направлением в изучении фундаментальных основ жизнедеятельности и последующей коррекции возрастных изменений. Сдвиги в обмене веществ в тканях и органах человека в ходе старения, в том числе, при возрастной инволюции кожи - закономерный процесс, характеризующийся постоянным развитием, прогрессирующим течением, зависящий от особенностей генотипа и затрагивающий все уровни биологической организации.

Известно, что при старении кожи происходит уменьшение продукции и дезорганизация основных структурных компонентов внеклеточного матрикса, активация катаболизма, усиливается протеолитическая деградация коллагеновых белков, снижается продукция тканевых ингибиторов матричных металлопротеиназ. При этом происходят не только количественные, но и качественные возрастные изменения, в первую очередь со стороны белков и углеводсодержащих биополимеров соединительной ткани: происходит накопление белков с измененной молекулярной массой, метаболически инертных и устойчивых к протеолизу.

Среди разнообразных воздействий на кожу для её омоложения, как в косметологии, так и эстетической медицине широкое применение находят нехирургические подходы, в том числе многочисленные инъекционные методы. Алгоритм коррекционных подходов диктуется предсказуемостью эффекта, патогенетической обоснованностью, удобством использования. При

этом эффект применения инъекционных препаратов должен быть направлен на создание физиологических и биохимических условий для повышения метаболической активности клеток кожи.

В диссертационной работе Б.Н. Сельской проведено экспериментальное исследование на крысах с целью изучения изменений метаболизма в коже животных молодого и зрелого возраста в области внутридермального введения препаратов нативного коллагена, изучены молекулярные механизмы данных изменений, обоснованы биохимические критерии коррекции возрастных изменений.

Таким образом, тема диссертационного исследования Сельской Бэлы Натановны безусловно актуальна для выяснения биохимических механизмов возрастных изменений в метаболизме кожи, возможных способов коррекции нарушенного обмена в коже в зонах введения коллагенсодержащих препаратов и является одной из важных задач медицины и биохимии.

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

Для реализации цели исследования, состоящей в выяснении изменений обмена коллагена и гликозаминогликанов в коже экспериментальных животных в области внутрикожного введения препаратов нативного коллагена автором были поставлены, а затем и решены ряд научных задач.

Работа является самостоятельным научным исследованием, проведенным на адекватном доказательном уровне. Объем научных исследований вполне достаточен. Проведено экспериментальное исследование на 190 самках белых крыс молодого и зрелого возраста, использованы классические и современные биохимические методы изучения показателей обмена коллагена и метаболизма углеводов в том числе, исследования на автоматическом биохимическом анализаторе, спектрофотометре, твердофазном иммуноферментном анализаторе, использовалась ионообменная хроматография. Кроме того применены гистологические и иммуногистохимические методы исследования. Полученные данные статистически обработаны с использованием пакета прикладных программ (методом вариационной и непараметрической статистики).

По итогам диссертационной работы сформулировано 5 выводов, которые соответствуют задачам исследования и отражают материалы

диссертационного исследования. Автором также обоснованы практические рекомендации.

Таким образом, объем материала, современные методы биохимических и гистологических исследований, проведенный статистический анализ не позволяют усомниться в обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, представленных в данной диссертационной работе.

Достоверность и новизна исследований, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Дизайн исследования, тщательный анализ и статистическая обработка данных не вызывает сомнений в достоверности полученных результатов, на основании которых были сформулированы выводы и практические рекомендации. Результаты экспериментальных исследований позволили автору изучить метаболические изменения в коже крыс-самок молодого и зрелого возраста в области внутридермального введения нативного немодифицированного коллагена I типа крупного рогатого скота, а также показать корригирующий эффект вводимого препарата на измененный обмен веществ в коже. Новизна исследования подтверждена патентом на изобретение Российской Федерации № 257168 от 25.11.2015 г. «Способы омоложения лица у пациентов с анатомо-физиологическими особенностями лицевой части черепа» и патентом на промышленный образец РФ № 101551 от 27.12.2016г. «Схема алгоритма коррекции суборбикулярной и среднещечной областей».

Содержащиеся в работе данные получены лично автором или при его непосредственном участии на всех этапах выполняемой работы: постановка цели и задач, выбор методов исследования, проведение экспериментов, статистическая обработка, оценка и анализ полученных результатов, написание статей, оформление диссертации. Авторский вклад в диссертационное исследование – 61,8%.

Основные положения и результаты исследования были доложены и обсуждены на региональных, российских и международных научных форумах. По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 7 в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертации.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов.

Проведенное исследование позволило существенно пополнить знания об изменениях метаболизма в коже крыс различного возраста. Показано, что введение препарата нативного коллагена техникой мезотерапии в первые дни характеризуется активацией резорбции и катаболизма коллагена. Выявлено превалирование анаэробных процессов с усилением гликогенолиза в первые дни после инъекции. В отдаленные сроки эксперимента (3-5 недель) усиливается коллагеногенез; гистохимически выявлена активация биосинтетической функции фибробластов кожи, о чем свидетельствует увеличение содержания в коже коллагена, сульфатированных и суммарных гликозаминогликанов; повышаются аэробные процессы по гликолитическому и пентозофосфатному путям окисления. Кроме того убедительно доказана важная роль в развитии регенеративных процессов кожи активных макрофагальных клеток с экспрессией ростовых факторов. Возрастание уровня инсулиноподобного фактора роста и трансформирующего фактора роста в крови, увеличение количества клеток, экспрессирующих маркеры пролиферации - антиген Ki-67 и фактор роста фибробластов-1 в коже.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.

Результаты проведенных исследований экспериментально подтверждают необходимость разработки определенных схем применения коллагенсодержащих препаратов в коже, подверженной возрастным изменениям. Новые сведения об изменениях метаболизма коллагена и гликозаминогликанов в коже при внутридермальном введении препарата нереконструированного коллагена I типа могут быть внедрены в образовательные программы подготовки обучающихся медицинских вузов, а также использоваться в работе специализированных, в том числе косметологических учреждений медицинского профиля.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности.

Диссертация изложена на 168 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, главы описания собственных материалов и методов исследования, главы результатов исследования, обсуждения результатов, выводов, списка сокращений, списка литературы включающей 299 источников, в том числе 162 иностранных и приложения; содержит 10 таблиц, 9 рисунков и 37 микрофотографий.

Во введении автор обосновывает выбор темы, ее актуальность, цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, научную новизну,

теоретическую и практическую значимость работы, апробацию результатов исследования, внедрение результатов исследования в практику.

Первая глава – обзор литературы изложен на 26 страницах, в котором подробно представлен анализ работ по изучению биохимических, молекулярно-биологических механизмов старения кожи, особенностей структуры, физико-химических свойств, обмена и физиологических функций коллагенов дермы кожи. Показана перспективность применения препаратов коллагенов для возможной коррекции возрастных изменений кожи. Обзор написан достаточно полно, тщательно выверен. Последние литературные источники датированы 2017 годом.

Во второй главе «Материалы и методы исследования» автором подробно описаны биохимические, гистологические и иммуногистохимические методики исследования биологического материала, представлен дизайн исследования. Основная часть методик - биохимические методы исследования коллагена и его фракций, гликозаминогликанов, показатели обмена углеводов, цитокинов. Статистические методы исследования включают как параметрические, так и непараметрические методы. Комплекс применённых лабораторных и инструментальных методов исследований современен и информативен.

Третья глава «Результаты собственных исследований» состоит из 4 подглав и посвящена биохимическому статусу экспериментальных животных, обмену коллагена кожи, уровню гликозаминогликанов и обмену углеводов в дерме, а так же изменение содержания некоторых интерлейкинов и факторов роста в сыворотке крови при интрадермальном введении препарата немодифицированного коллагена.

Представлена характеристика изменений гистологической структуры кожи экспериментальных животных в области внутридермального введения препаратов нереконструированного коллагена. Результаты иммуногистохимических исследований с применением моноклональных антител на белок Ki-67 и фактор роста фибробластов-1 показали, что после введения крысам коллагенового препарата усиливаются процессы пролиферации клеток эпителия кожи, эндотелиальных клеток стенки сосудов фибробластов, а так же клеток в матрице волосяных фолликул участвующих в регенерации эпителия; возросло среднее количество клеток экспрессирующих белок, усиливающего пролиферацию фибробластов, который является основным источником нового коллагена кожи.

В главе «Обсуждение результатов исследования» Б.Н. Сельская подробно обсуждает полученные результаты, анализирует данные проведенных исследований, раскрывает возможные биохимические механизмы изменений метаболизма в стареющей коже и доказывает положительный эффект введения коллагеносодержащего препарата отечественного производства КОЛЛОСТ на измененный обмен веществ в коже.

Выводы отражают основные результаты диссертационного исследования. Все они конкретны, объективны, соответствуют поставленным задачам, отражают суть и результаты работы, подтверждаются представленным материалом. Практические рекомендации вытекают из собственных исследований автора, могут быть использованы в работе специализированных медицинских учреждений.

Содержание автореферата отражает основные положения работы.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе соискателя в целом.

Структура и содержание работы свидетельствуют о самостоятельно выполненном научном исследовании, в котором получены новые сведения об изменениях метаболических процессов в коже молодых и зрелых крыс, изучены молекулярные механизмы данных изменений, а также обоснованы биохимические критерии коррекции возрастных изменений с помощью коллагеносодержащего препарата. Результаты диссертационного исследования отражены в 14 публикациях, из них 7 работ опубликовано в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертации, получено 2 патента на изобретение и промышленный образец. Материалы диссертационной работы представлены и обсуждены на научных форумах различного уровня.

Принципиальных возражений ни основная концепция работы, ни положения, выносимые на защиту, ни полученные фактические данные не вызывают.

В качестве замечаний можно отметить следующее:

1. Ни в диссертации, ни в автореферате нет подробного описания техники мезотерапии, хотя, автор неоднократно упоминает этот термин.

2. Одни и те же термины обозначаются по-разному, например: гидроксипролин – оксипролин.
3. В обзоре литературы отсутствует описание нейроэндокринного контроля фиброгенеза в целом и коллагеногенеза в частности.
4. В работе встречаются отдельные ошибки, опечатки, неудачные выражения.

Указанные замечания не существенны и не умаляют значимость работы.

В плане продолжения научной дискуссии хотелось бы поставить ряд вопросов перед соискателем:

1. На стр. 6 диссертации Вы пишете: «Впервые в области внутридермального введения препарата коллагена охарактеризовано состояние окислительного обмена углеводов». Что вы подразумеваете под термином окислительный обмен углеводов?
2. Чем обусловлены сроки забоя экспериментальных животных?
3. Что вы имеете в виду под термином коллагенолитическая активность?
4. В обзоре литературы, на наш взгляд, нужно было коснуться роли макрофагов в регуляции деятельности фибробластов. Известно, что именно от макрофагов зависит будет ли рост соединительной ткани сбалансированным или наоборот произойдет смещение в сторону усиления фиброза, либо в сторону усиления деградации соединительной ткани.
5. В диссертации Вы указываете что нейтральносолеорастворимая фракция коллагена - это показатель усиления синтетических процессов в коже, при этом на стр. 98 главы «Обсуждение полученных результатов» Вы говорите о том, что увеличение нейтральносолеорастворимой фракции коллагена в местах инъекции вводимого препарата связано с его активной деградацией. Нет ли здесь противоречия?
6. Известно, что белки соединительной ткани, в том числе коллаген, одни из самых медленнообновляемых и с возрастом больше подвержены процессам свободнорадикального окисления, а так же неферментативного гликозилирования. С учетом вышесказанного, какие биохимические механизмы преобладают в изменении обмена коллагена в коже взрослых крыс: перекисное окисление липидов или же неферментативное гликирование изучаемого белка?

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней

Таким образом, диссертационная работа Сельской Бэлы Натановны на тему «Метаболизм коллагена и гликозаминогликанов в коже экспериментальных животных при интрадермальном введении коллагенсодержащего инъекционного препарата» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором экспериментальных исследований выявлены изменения в обменных процессах коллагена и гликозаминогликанов в коже крыс молодого и зрелого возраста, изучены молекулярные механизмы корректирующего действия коллагенсодержащего препарата КОЛЛОСТ для активации метаболических процессов в коже, разработаны теоретические и практические рекомендации, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, имеющее важное значение для медицины, а именно биохимии, изучающей метаболические сдвиги при старении организма. По актуальности, новизне и практической значимости диссертация Сельской Бэлы Натановны полностью соответствует критериям, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями от 21.04.2016 № 335), а её автор Сельская Бэла Натановна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент: Бутолин Евгений Германович
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой клинической биохимии
и лабораторной диагностики факультета
повышения квалификации и профессиональной
переподготовки. ФГБОУ ВО «Ижевская
государственная медицинская академия» Минздрава России
426034, Удмуртская Республика, г. Ижевск, ул. Коммунаров, д. 281
Телефон 8 (3412) 52-62-50

e-mail: rector@igma.udm.ru

Подпись д.м.н. (14.00.17 – нормальная физиология) профессора Е.Г. Бутолина заверяю:

Начальник отдела кадров

С.П. Овечкина

03.12.2018

