

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, Посыпановой Галины Ароновны на диссертацию Бобровой Марии Михайловны "Разработка и исследование скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени для биоинженерных конструкций", представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.24 - трансплантология и искусственные органы.

Актуальность темы диссертации

Одной из задач современной регенеративной медицины является разработка эффективных способов восстановления поврежденных органов и тканей. Для создания медицинских изделий и конструкций широко используются синтетические материалы, одним из преимуществ которых являются улучшенные механические свойства. Недостатком таких материалов является отсутствие необходимой естественной архитектуры, микро- и наноструктурных особенностей органов и тканей.

Децеллюляризация органов, то есть удаление клеточного материала из ткани, является перспективной технологией создания трансплантатов для регенеративной медицины и тканевой инженерии. При использовании данного метода сохраняется структура, состав, сосудистое русло и биологическая активность межклеточного матрикса. Компоненты межклеточного матрикса в составе изделий создают естественное микроокружение, благоприятное для клеток.

При получении скаффолд-конструкций, содержащих компоненты, естественного происхождения, необходим наномасштабный контроль пространственной морфологии и структуры. В диссертационном исследовании был использован современный метод сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ), который позволяет исследовать сохраненную природную трехмерную микро- и наноструктуру биоматериалов, в том числе и децеллюляризованной ткани, с разрешением в десятки нанометров.

Таким образом, тема данного диссертационного исследования является актуальной и представляет научный интерес в области регенеративной медицины и тканевой инженерии.

Научная новизна результатов исследования, их теоретическая и практическая значимость.

М.М. Боброва разработала оригинальные методики создания конструкций на основе децеллюляризованной ткани печени крысы в виде макрочастиц, фрагментов межклеточного матрикса и двумерных композитных матриц (скаффолдов) из фиброина шелка. Впервые в рамках работы методом СЗНТ охарактеризованы микро- и наноструктурные особенности полученных конструкций. Продемонстрировано, что биodeградируемые скаффолды на основе децеллюляризованной ткани печени в виде макрочастиц, фрагментов межклеточного матрикса и композитных пленок не проявляют токсичности в экспериментах *in vitro* и способствуют повышению выживаемости и метаболической активности клеток модельных линий. Впервые показан высокий регенеративный потенциал биodeградируемых конструкций на основе децеллюляризованной ткани печени в виде фрагментов межклеточного матрикса и 2D композитных скаффолдов *in vivo* в экспериментальной модели заживления полнослойной раны кожи крысы. В работе обоснованы и определены преимущества и свойства разработанных биodeградируемых скаффолдов.

Результаты диссертационного исследования М.М. Бобровой представляют существенную научную и практическую значимость. Автором на основе полученных результатов разработан эффективный метод создания композитных пленок на основе фиброина шелка путем включения в состав микрочастиц децеллюляризованной ткани печени крысы, позволяющий получить конструкцию с наноструктурированной поверхностью и улучшенными биологическими свойствами. В рамках диссертационного исследования было продемонстрировано, что микро- и наноструктурные особенности топографии поверхности разработанных конструкций

определяют высокий уровень регенеративного потенциала *in vitro* и *in vivo*. На основании полученных данных по изучению биологических свойств и структуры скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени крысы можно рекомендовать разработанные биodeградируемые матрицы для проведения дальнейших доклинических исследований, поскольку описанные в работе методы позволят разработать универсальные бесклеточные платформы для создания персонализированных биомедицинских клеточных продуктов.

Научная новизна и значимость диссертационного исследования М.М. Бобровой подтверждена публикациями (13 статей в рецензируемых журналах). Результаты работы также были представлены в виде докладов на 11 международных и отечественных конференциях и опубликованы в соответствующих сборниках. М.М. Боброва является автором пяти патентов, оформленных с использованием результатов диссертационного исследования.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов диссертации

Основные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе научно обоснованы, закономерно следуют из результатов. Научные положения и выводы диссертационной работы М.М. Бобровой базируются на достаточном объеме мультидисциплинарных исследований с использованием современных лабораторных и инструментальных методов анализа. Работа выполнена на хорошем научно-методическом уровне с использованием современных методов. Достоверность результатов благодаря соблюдению требований статистики при проведении экспериментов и статистической обработке полученных результатов не вызывает сомнений.

Оценка содержания и завершенности диссертации, достоверности результатов и выводов

Диссертационная работа М.М. Бобровой построена по классическому принципу и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, описание результатов исследования, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 180 источников. Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста, иллюстрирована 34 рисунками и содержит 7 таблиц.

Введение посвящено актуальности исследования, изложены цели и задачи работы. Сформулированы положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая значимость диссертации.

Обзор литературы занимает 27 страниц и представлен шестью разделами. В первых трех разделах обсуждаются современные проблемы создания эффективных тканеинженерных конструкций и применения технологии децеллюляризации. Автор акцентирует внимание на вопросах строения и функции межклеточного матрикса печени, технологии децеллюляризации органов, исследованию структуры и состава получаемого межклеточного матрикса. Четвертый раздел посвящен витализации децеллюляризованной печени и возможности использования рецеллюляризованной печени для трансплантации. В пятом и шестом разделах описаны области применения децеллюляризованной ткани различных органов, проанализированы сложности и ограничения метода, а также указываются неизученные аспекты параметров децеллюляризованной ткани и форм изделий на основе межклеточного матрикса.

Обзор охватывает современные сведения по изучаемым вопросам, вводит читателя в круг анализируемых автором проблем и оставляет хорошее впечатление.

В главе "Материалы и методы" (18 страниц) подробно описаны все использованные автором материалы и почти все методы, с помощью которых проводилось исследование. "Почти" – потому, что не описана методика ДНК-

электрофореза (или не приведена ссылка). Все использованные методы полностью адекватны поставленным задачам.

Собственные результаты автора (42 страницы) изложены в соответствующей главе. Автором были подобраны оптимальные параметры протокола децеллюляризации печени крысы, проведен анализ сосудистого русла, межклеточного матрикса, гистологическое исследование, анализ остаточной ДНК и биохимического состава децеллюляризованной ткани. На основе децеллюляризованной ткани печени получены конструкции-скаффолды в виде макрочастиц, лиофилизированных фрагментов и пленок на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами межклеточного матрикса печени. Изучены микро- и наноструктурные особенности всех конструкций методом сканирующей зондовой нанотомографии, проведены тесты на цитотоксичность и биосовместимость *in vitro*. Изучен регенеративный потенциал *in vivo* лиофилизированных фрагментов и скаффолдов в виде пленок на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами межклеточного матрикса печени в экспериментальной модели заживления полнослойной раны кожи у крысы. Показано, что такие конструкции ускоряют заживление раны в среднем в два раза, что подтверждает высокий уровень регенеративного потенциала изделий на основе децеллюляризованной ткани, полученных по разработанным оригинальным методикам. Результаты исследований подробно описаны и проиллюстрированы 34 рисунками и 6 таблицами.

В главе "Обсуждение" (14 страниц) проведен анализ полученных автором результатов и их сопоставление с литературными данными. Основываясь на полученных данных, автор рассматривает возможность применения разработанных конструкций не только для регенерации кожи, но и в качестве носителей клеток для гепатоцитарной трансплантации и для получения гидрогелей. Глава прекрасно написана.

В "Заключении" автор подводит итоги исследования, обобщая полученные результаты. Все шесть выводов диссертационной работы

логично вытекают из полученных данных, адекватны и обоснованы, соответствуют поставленным задачам.

Замечания по содержанию и оформлению диссертационной работы.

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертационной работы М.М. Бобровой нет.

Замечания и вопросы не принципиального характера:

1. Говорить о пролиферативной активности, основываясь на данных МТТ-теста, некорректно. Для оценки пролиферативной активности используются специфические маркеры, такие как Ki67 или BrdU (EdU). МТТ-тест отражает, в первую очередь, уровень метаболизма клеток и часто (но не всегда) используется для оценки их выживаемости.
2. Непонятно, каким образом автор оценивал влияние конструкций на основе фиброина на адгезивные свойства клеток.
3. Не очень понятны данные, приведенные на рис. 27 (цитотоксичность скаффолдов на основе фиброина шелка): через 3 сут выживаемость клеток, культивируемых в присутствии пленок обоих типов, не отличается от таковой через 5 сут, но увеличивается через 7 сут. Необходимо прокомментировать. Кроме того, отсутствует контроль – оптическая плотность лунок, не содержащих клеток, а содержащих только культуральную среду и скаффолды.
4. На фотографиях на рисунках 30 и 31 (ряды Б и В) присутствует синий фон. Это неспецифическая сорбция DAPI или не отмылась ДНК?
5. На графике, приведенном на рисунке 33, отсутствуют планки погрешностей (разбросы).
6. В диссертации не указаны критерии подбора концентрации микрочастиц, используемых для разработки композитных скаффолдов.

Следует подчеркнуть, что замечания носят лишь частный характер и ни в коем случае не умаляют достоинств диссертационной работы.

Подтверждение опубликований основных результатов диссертации в научной печати

По материалам исследования опубликовано 13 статей, из них 10 в российских журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, включенных в Перечень ВАК РФ, и индексируемых в базах данных Web of Science или Scopus, 3 статьи опубликованы в зарубежных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Также по результатам диссертационной работы оформлено пять российских патентов.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями, предъявляемыми к авторефератам, дает полное представление об основных положениях диссертации и соответствует ее содержанию.

Заключение

Диссертационная работа М.М. Бобровой "Разработка и исследование скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени для биоинженерных конструкций", представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы, является самостоятельной цельной законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научно-практическая задача, имеющая существенное значение для трансплантологии и регенеративной медицины – разработаны биodeградируемые скаффолды на основе децеллюляризованной ткани печени и доказан их высокий регенеративный потенциал.

По своему содержанию, уровню проведенных исследований, актуальности выбранной темы, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности полученных результатов, их новизне, научной и практической значимости диссертационная работа Бобровой Марии Михайловны "Разработка и исследование скаффолдов на основе

децеллюляризованной ткани печени для биоинженерных конструкций" соответствует требованиям п.9-14 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. №842 с внесенными изменениями от 30.06.2014 №72, 21.04.2016 №335, 02.08.2016 №748, 29.05.2017 №650, 28.08.2017 №1024 и 01.10.2018 №1168, предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Боброва Мария Михайловна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы.

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Г.А.

Посыпанова Г.А.

«25» 09 2019 г.

Подпись д.б.н. Посыпановой Галины Ароновны заверяю

Главный ученый секретарь ФГБУ
"Национальный исследовательский
центр "Курчатовский институт"



П.А. Форш

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт".

Почтовый адрес: 123182, Российская Федерация, г. Москва, площадь Академика Курчатова, дом 1.

Телефон: +7 (499) 196-9539

Электронная почта: nrcki@nrcki.ru

Адрес в сети интернет: www.nrcki.ru