

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Посыпановой Галины Ароновны на диссертацию Сафоновой Любови Александровны "Разработка и исследование 2D и 3D биodeградируемых скаффолдов на основе фиброина шелка для регенеративной медицины", представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы.

Актуальность темы диссертации

Одним из важных и актуальных направлений тканевой инженерии и регенеративной медицины является создание искусственных органов. Важнейшим компонентом искусственного органа является каркас или "скаффолд", который далее заселяется компетентными клетками. При создании каркаса искусственного органа необходимо подобрать материал, который должен обеспечивать оптимальные механические свойства, биосовместимость, биodeградацию, отсутствие токсичности, а также возможность формирования конструкции, соответствующей структуре восстанавливаемой ткани или органа. Несмотря на то, что в тканевой инженерии используется широкий спектр материалов, как синтетических, так и природного происхождения, все они имеют те или иные недостатки, ограничивающие их применение. Поэтому поиск новых материалов, пригодных для создания искусственных конструкций, безусловно, является актуальной задачей.

В ходе диссертационного исследования Л.А. Сафоновой были разработаны технологии получения биodeградируемых матриц-скаффолдов на основе фиброина шелка в виде двумерных (2D) пленок и пространственных (3D) микроволокнистых скаффолдов, изучена структура

и пространственная морфология полученных конструкций, их биологические свойства; продемонстрирован высокий регенеративный потенциал пленок и микроволокнистых скаффолдов на модели заживления полнослойной раны кожи крысы. Таким образом, тема диссертационной работы Л.А. Сафоновой представляет значительный научный интерес и является актуальной для развития современной тканевой инженерии и трансплантологии.

Научная новизна результатов исследования, их теоретическая и практическая значимость.

Л.А. Сафоновой впервые методом электроспиннинга получены микроволокнистые скаффолды на основе фиброина шелка и рекомбинантных спидроинов 2E12 и 2E12-RGD, охарактеризованы их биологические свойства и показан высокий регенеративный потенциал данных конструкций в модели заживления полнослойной раны кожи крысы.

Впервые исследованы особенности микро- и наноструктуры полученных конструкций методом сканирующей зондовой нанотомографии. Показана внутренняя структура 2D скаффолдов в виде пленок на основе фиброина шелка, представленная глобулами, и отсутствие пор во внутренней структуре пленок. Показана глобулярная внутренняя структура отдельных волокон в составе 3D скаффолдов, а также получены уникальные данные об объемной пористости и отношении поверхности к объему скаффолдов.

Результаты диссертационного исследования Л.А. Сафоновой представляют существенную научную и практическую значимость. В ходе диссертационного исследования автор разработал методики, которые позволяют получить скаффолды на основе фиброина шелка в виде пленок методом полива (2D скаффолды) и в виде трехмерных пористых микроволокнистых конструкций (3D скаффолды) методом

электроспиннинга, а также скаффолды, содержащие различные композитные добавки.

Изучены структура и биологические свойства полученных скаффолдов, которые позволяют сделать выводы об отсутствии токсического эффекта на клетки, способности скаффолдов поддерживать адгезию и пролиферацию клеток, и главное, высокого регенеративного потенциала скаффолдов на основе фиброина шелка, продемонстрированного в экспериментах *in vivo*. Полученные результаты предварительных исследований структуры и биологических свойств пленок и микроволокнистых скаффолдов на основе фиброина шелка позволяют рекомендовать данные конструкции для проведения доклинических исследований с целью их использования в тканевой инженерии и регенеративной медицине.

Научная новизна и значимость диссертационного исследования Л.А. Сафоновой подтверждена публикациями (12 статей в рецензируемых журналах). Результаты работы также были представлены в виде докладов на 11 международных и отечественных конференциях и опубликованы в соответствующих сборниках. Л.А. Сафонова 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. Работа выполнена на хорошем научно-методическом уровне. Достоверность результатов, представленных в диссертационной работе, не вызывает сомнений. Статистическая обработка результатов проведена корректно и позволяет в полной мере обосновать выводы диссертации и

положения, выносимые на защиту. Автором использованы современные физико-химические и биологические методы исследования, которые позволяют получить достоверные результаты и сформулировать основные положения и выводы.

Оценка содержания и завершенности диссертации, достоверности результатов и выводов

Диссертационная работа Л.А. Сафоновой 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 113 источников. Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста, иллюстрирована 27 рисунками и содержит 7 таблиц.

Введение посвящено обоснованию актуальности исследования, изложены цель и задачи работы, новизна и практическая значимость. Задачи соответствуют поставленной цели, положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно.

В главе 1 ("Обзор литературы"), автор анализирует основные сведения о структуре и свойствах фиброина шелка, что позволяет обосновать выбор данного материала для получения конструкций в ходе работы. Автором приведены примеры применения фиброина шелка в различных областях тканевой инженерии и регенеративной медицины, что позволяет рассматривать его как перспективный материал для применения. Небольшая часть обзора литературы затрагивает свойства и сферы применения коллагена и рекомбинантных спидроинов, которые автор в своей работе использует как композитные добавки в составе скаффолдов. Обзор литературы основан на современных исследованиях российских и зарубежных научных групп. Проведенный анализ литературы позволяет

считать данное исследование актуальным и обоснованным. Обзор написан хорошим литературным языком, читается легко и с большим интересом.

В главе "Материалы и методы" подробно описаны все использованные автором материалы и все методы, с помощью которых проводилось исследование. Все использованные методы полностью адекватны поставленным задачам.

Собственные результаты автора изложены в главе 3. Данная глава хорошо структурирована и включает 6 разделов, при этом результаты исследований свойств пленок и микроволокнистых скаффолдов рассматриваются в одних и тех же разделах, что позволяет сравнить эти конструкции.

В пяти разделах автор приводит перечень и состав полученных конструкций, данные об их структуре и свойствах. С использованием метода полива автор получил 4 вида образцов 2D биodeградируемых скаффолдов в виде пленок на основе фиброина шелка с общей концентрацией белка 20 мг/мл: из водного раствора фиброина, из водного раствора фиброина, содержащие 30% коллагена; из раствора фиброина в муравьиной кислоте; из раствора фиброина в муравьиной кислоте, содержащие 30% коллагена. С помощью метода электроспиннинга были получены 4 вида пористых микроволокнистых 3D скаффолдов на основе растворов полимеров в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-пропанол-2 с общей концентрацией белка 50 мг/мл: микроволокнистые скаффолды из фиброина шелка, из фиброина, содержащие 30% желатина, из фиброина, содержащие 30% рекомбинантного спидроина 2E12 и микроволокнистые скаффолды из фиброина шелка, содержащие 30% рекомбинантного спидроина 2E12-RGD. Все конструкции были охарактеризованы с помощью сканирующей электронной микроскопии, сканирующей зондовой нанотомографии и атомно-силовой микроскопии. Исследованы механические свойства полученных конструкций и скорость их деградации. Обнаружено, что внутренняя структура всех 2D скаффолдов

представляет собой плотно упакованные глобулы размерами от 10 до 30 нм, не имеет микро- и нанопор. Поверхность 2D скаффолдов характеризуются рельефом в виде наношероховатостей в диапазоне 30-90 нм. Отличий во внутренней структуре 2D скаффолдов различного состава выявлено не было. Микроволокнистые 3D скаффолды состояли из волокон со средним диаметром 300-700 нм, которые неупорядоченно распределены в объеме скаффолдов. Средняя объемная пористость скаффолдов составляла 85,7% , среднее отношение поверхности к объему $34,2 \text{ мкм}^{-1}$. Внутренняя структура волокон была неоднородной, состояла из плотно упакованных глобул размером от 10 до 30 нм. Отличий во внутренней структуре микроволокнистых 3D скаффолдов различного состава также выявлено не было. Механическая прочность на разрыв 2D скаффолдов на основе фиброина шелка находилась в диапазоне от 1,44 МПа до 4,29 МПа, эластичность – в диапазоне от 30% до 89%, что свидетельствует о пригодности полученных 2D скаффолдов для хирургических манипуляций.

Шестой раздел посвящен исследованию биосовместимости полученных конструкций и включает результаты исследований *in vitro* и *in vivo*. Л.А. Сафонова показала, что полученные 2D и 3D скаффолды не оказывают цитотоксическое действие *in vitro* на клетки эмбриональных фибробластов мыши линии 3Т3 и гепатоцеллюлярной карциномы линии НерG2; поддерживают адгезию и пролиферацию клеток указанных линий.

Результаты изложены логично и последовательно, данный раздел содержит 27 рисунков и 6 таблиц.

Глава 4 представляет собой развернутое обсуждение результатов диссертационного исследования. Автор анализирует и обобщает полученные результаты, сопоставляет их с литературными данными, обсуждает возникшие в ходе работы проблемы и способы их разрешения. Основываясь на полученных данных, автор рассматривает возможность и оценивает перспективность применения полученных конструкций для различных задач тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Закljučают работу 7 выводов. Все выводы диссертационной работы логично вытекают из полученных результатов, адекватны и обоснованы, соответствуют поставленным задачам.

Замечания по содержанию и оформлению диссертационной работы.

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертационной работы Л.А. Сафоновой нет.

Замечания 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. На графике, приведенном на рисунке 26, отсутствуют планки погрешностей (разбросы).

3. Возможно, следовало бы изучить также энзиматическую деградацию 2D пленок. А также скорость деградации полученных 3D конструкций. Но это, скорее пожелание, чем замечание.

Следует подчеркнуть, что замечания носят лишь частный характер и ни в коем случае не снижают высокой оценки диссертационной работы.

В целом, диссертационная работа Л.А. Сафоновой отличается логическим построением, хорошо структурирована, написана хорошим литературным языком, практически не содержит опечаток.

Подтверждение опубликований основных результатов диссертации в научной печати

По материалам исследования опубликовано 12 статей в российских и зарубежных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science или

Scopus. Из них 9 статей в российских журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ и 3 статьи в зарубежных журналах. 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 Л.А. Сафоновой "Разработка и исследование 2D и 3D биodeградируемых скаффолдов на основе фиброина шелка для регенеративной медицины", 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 методики получения конструкций на основе фиброина шелка и доказан их высокий регенеративный потенциал.

По своей актуальности, научной новизне, содержанию, объему и уровню проведенных исследований, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности полученных результатов научной и практической значимости диссертационная работа полностью 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, Сафонова Любовь Александровна, 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
"Курчатowski институт"

Посыпанова Г.А.

«25» 09 2019 г.

Подпись д.б.н. Посыпановой Галины Ароновны заверяю

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



П.А. Форш

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный исследовательский центр "Курчатowski 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