

УТВЕРЖДАЮ:
Директор Федерального государственного
учреждения «Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии»



Российской академии наук,
доктор биологических наук
А.Н. Федоров
_____ 2024
М.А.Ж.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук» на диссертацию **Толстовой
Татьяны Викторовны** «Получение и исследование в модели *in vitro*
скаффолдов на основе биodeградируемых полимеров для регенеративной
медицины», представленную на соискание учёной степени кандидата
химических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология

Актуальность темы диссертации. Тканевая инженерия представляет собой новую область медицинской биотехнологии, которая открывает многообещающие перспективы для преодоления ограниченной эффективности традиционных методов, которые в настоящее время используются в регенеративной медицине для восстановления тканей. Что касается классической трансплантологии, то в настоящее время стремительно увеличивается дефицит донорских органов, что подтверждает необходимость поиска альтернативных методов восстановления поврежденных и/или утраченных тканей, а в будущем - целых органов.

Прогресс тканевой инженерии зависит от успехов ученых в области клеточных технологий и поиске новых биоматериалов, необходимых для получения имитирующих внеклеточный матрикс скаффолдов. Хитозан представляет собой перспективный биополимер, который удовлетворяет большинству требований к скаффолдам, среди которых следует особо отметить биосовместимость и биodeградацию. Однако область применения

матрикс на основе хитозана ограничена достаточно низкими механической прочностью и скоростью биодegradации. Получение композитных биоматериалов является актуальной задачей для преодоления недостатков однокомпонентных матрикс (скаффолдов) в тканевой инженерии, а также для варьирования их важных физико-химических свойств, необходимых для прикрепления, роста и пролиферации или дифференцировки клеток. Именно решению этой задачи посвящена работа Толстовой Т.В. Таким образом, актуальность диссертации не вызывает сомнений.

Содержание диссертации. Работа Толстовой Т.В. изложена на 134 страницах и включает 18 рисунков и 5 таблиц. Работа имеет стандартную структуру, в частности разделы введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 222 источников.

Литературный обзор посвящен описанию и тщательному анализу существующих на сегодняшний день подходов к созданию различных биодegradируемых матрикс, в частности гидрогелей для тканевой инженерии и регенеративной медицины. Подробно рассмотрены компоненты триады тканевой инженерии, а именно клеточные технологии и материалы для изготовления скаффолдов. Автором всесторонне рассмотрены некоторые физико-химические свойства, а также преимущества и недостатки различных природных и синтетических полимеров, применяемых для получения полимерных скаффолдов. Особое внимание уделено хитозану и полимолочной кислоте (полилактидам), поскольку именно они являются ключевыми компонентами, на основе которых были получены биодegradируемые матриксы (пленки и макропористые гидрогели), использованные в данной работе. Кроме того, автором подробно рассмотрены главные параметры скаффолдов, определяющие эффективность культивирования и направление дифференцировки различных клеток, культивируемых на них. Таким образом, обзор литературы достаточно полно описывает текущие задачи тканевой инженерии и подводит к цели и задачам

диссертации. Стоит отметить, что обзор литературы написан логично, грамотно и оставляет самое приятное впечатление. Обширный список литературы (222 источника) подтверждает широкий научный кругозор автора и умение работать с литературой.

В главе Материалы и методы в полной мере представлены все используемые в работе реактивы и протоколы исследований.

В главе Результаты и их обсуждение подробно и логично описаны результаты работы. Так, макропористые гидрогели на основе сополимеров хитозана с олиголактидами охарактеризованы по структуре (конфокальная лазерная микроскопия), изучены их некоторые физико-химических свойства, например, набухаемость и биодegradация. Кроме того, исследована цитотоксичность всех матриц (пленок и гидрогелей) для клеток мышечных фибробластов L929 (с помощью МТТ-анализа), а также изучена их иммуногенность с использованием клеток линии острого моноцитарного лейкоза человека (THP-1). Кроме того, представлены результаты исследования длительного культивирования различных типов клеток на макропористых гидрогелях и дифференцировки стволовых клеток на плёнках в модели *in vitro*. Все результаты хорошо проанализированы, грамотно интерпретированы и обсуждены с привлечением аналогичных результатов, описанных в литературе. Таким образом, материал, изложенный в данной главе, полностью отражает ход проделанной Толстой Т.В. работы.

В главе Заключение подведены общие итоги проделанной работы.

Научная новизна. Впервые макропористые гидрогели на основе хитозана и его сополимеров с олиго(L,L-/L,D-лактидами) (Хит-LL, Хит-LD) были охарактеризованы с точки зрения их физико-химических свойств (структура, средний размер пор и распределение пор по размерам, степень набухания, деградация в модели *in vitro*, механические свойства). Впервые исследована цитотоксичность гидрогелей с использованием линии мышечных фибробластов (L929), а также их иммуногенность по активации клеток линии

моноцитов человека (ТНР-1) в моделях *in vitro*. Впервые показано, что гидрофильно-гидрофобный баланс и кинетика биodeградации гидрогелей на основе сополимеров хитозана с олиголактидами зависят от типа привитого олиголактида. Продемонстрировано, что все матриксы поддерживали прикрепление, рост и пролиферацию различных типов животных клеток (мышинные фибробласты L929, мезенхимальные стромальные клетки (МСК), выделенные из жировой ткани человека). Впервые установлено, что пленки на основе сополимеров Хит с олиголактидами могут влиять на остео- и/или адипогенный потенциал МСК, причем усиление этого потенциала зависит от типа привитого олиголактида. Таким образом, научная новизна работы Толстой Т.В. очевидна.

Теоретическая и практическая значимость. Толстой Т.В. получены важные результаты, которые позволяют расширить знания о влиянии структуры и физико-химических свойствах композитных матриксов (пленок и макропористых гидрогелей) на поведение, а также пролиферацию и/или дифференцировку культивируемых на/в них клеток. В работе показано, что варьирование полимерного состава пленок позволяет направлять дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток человека, в частности усиливать остео- и/или адипогенез.

Практическая значимость работы заключается в том, что на основе матриксов из сополимеров хитозана с олиголактидами могут быть созданы новые эффективные скаффолды для регенеративной медицины, в частности для усиления дифференцировочного потенциала МСК при регенерации костной и/или жировой тканей. Полученные результаты могут быть полезны для применения этих материалов в различных других областях, например, таких как доставка лекарств.

Таким образом, теоретическая ценность и практическая значимость работы не оставляют сомнений.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов. Диссертация Толстой Т.В. отличается хорошей логикой с

момента формулирования цели и задач до обсуждения полученных результатов и сделанных из них выводов. Полученные в работе матриксы охарактеризованы с использованием самых современных физико-химических и молекулярно-биологических методов исследования, в том числе таких, как оптическая и конфокальная сканирующая лазерная микроскопия, проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ, метод ПЦР в реальном времени и др. Сходимость и согласованность результатов свидетельствуют о достоверности представленных выводов.

Результаты работы были опубликованы в 18-ти печатных работах, из которых 4 статьи в индексируемых в наукометрических базах данных Scopus и/или Web of Science журналах (Polymers (Q1 IF5.0), Stem Cell Research & Therapy (Q1 IF8.0), а также были представлены на международных российских и конференциях в виде постеров и устных докладов.

К работе имеется ряд вопросов:

1. В работе продемонстрированы результаты исследования структуры с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Не совсем понятно, почему автором был выбран данный метод вместо сканирующей электронной микроскопии, которую использует большинство других исследователей.

2. Почему в качестве фермента для исследования биodeградации хитозана и матриксов на его основе был выбран лизоцим? Почему выбрана именно такая концентрация (2 мг/мл)?

3. Чем обоснован выбор хитозана с молекулярной массой 80 кДа для получения сополимеров с олиголактидами? Использовали ли хитозан с другой молекулярной массой?

Заключение

Перечисленные замечания не снижают научную ценность диссертации Толстовой Т.В. По всем критериям, в том числе по актуальности поставленной задачи, а также новизне и значимости полученных результатов диссертация полностью соответствует требованиям «Положения о

присуждении ученых степеней” (утверждено Постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. №335; 02.08.2016 г. №748; 29.05.2017 г. №650; 20.03.2021 г. №426; 11.09.2021 г. №1539; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101), а автор диссертации Толстова Т.В., несомненно, достойна присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Отзыв рассмотрен и утверждён на заседании Лаборатории инженерии биополимеров 15 мая 2014 г. протокол № 01.

Отзыв подготовил:

Заведующий лабораторией
доктор химических наук, профессор
специальность 1.5.6 – Биотехнология

 Варламов В.П.

Подпись удостоверяю:

Секретарь заседания учёная степень: кандидат хим.наук , учёное звание:
старший научный сотрудник Лопатин С.А.





Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Адрес: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2

Телефон: +7 (495) 954-52-83/ +7(916) 636-70-17

Адрес varlamov@biengi.ac.ru