

ОТЗЫВ

Официального оппонента 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. В настоящее время существует проблема нехватки донорских органов для трансплантации, поэтому необходимо искать альтернативные методы восстановления поврежденных или утраченных тканей и органов. Тканевая инженерия — это новое направление медицинской биотехнологии, успехи которой в преодолении органной недостаточности зависят от прогресса в области клеточных технологий и разработки новых биоматериалов. Особое место занимают полимерные биodeградируемые материалы, из которых изготавливают матрицы (скаффолды), выполняющие роль подложки для прикрепления, роста и/или пролиферации/дифференцировки клеток с последующим формированием новых тканей. Одним из перспективных биополимеров, который может быть использован для этих целей, является хитозан. Он обладает такими важными свойствами, как биосовместимость и способность к биodeградации. Тем не менее, применение скаффолдов на его основе ограничено из-за их невысокой механической прочности и относительно медленной биodeградации. Для тканевой инженерии важно преодолеть эти недостатки однокомпонентных матриц, например, путем создания многокомпонентных систем и варьирования их физико-химических свойств. Успехи в решении данных задач необходимы для прикрепления, роста, пролиферации и дифференцировки клеток на этих скаффолдах. Работа Толстовой Т. В. посвящена решению актуальной задачи — получению новых композитных биоматериалов и исследования их функциональных характеристик. Поэтому актуальность диссертации не вызывает сомнений.

Содержание диссертации. Диссертация Толстовой Т. В. состоит из 134 страниц, содержит 18 рисунков и 5 таблиц. Работа имеет классическую структуру: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, изложение результатов и их обсуждение, заключение, выводы. Список литературы включает 222 источника.

В литературном обзоре Толстова Т.В. проанализировала современные подходы преодоления органной недостаточности, одним из которых, является разработка тканеинженерных конструкций на основе биоразлагаемых материалов. Рассмотрены физико-химические свойства, преимущества и недостатки различных природных и синтетических полимеров, используемых для получения полимерных скаффолдов.

Поскольку работа Толстой Т.В. посвящена получению и исследованию матриц на основе хитозана и олигомеров молочной кислоты, этим компонентам уделено особое внимание в литературном обзоре. Кроме того, в работе подробно описаны актуальные на сегодняшний день клеточные технологии, необходимые для успешной наработки культивируемых на скаффолдах клеток. Сообщается о ключевых параметрах скаффолдов на основе хитозана, определяющих эффективность культивирования и направление дифференцировки различных культивируемых на них клеток. В литературном обзоре были обозначены ключевые проблемы и задачи тканевой инженерии, что позволило логично сформулировать цель и задачи диссертации. Обзор литературы хорошо структурирован и грамотно написан. Обширный список актуальной литературы подтверждает умение Толстой Т.В. работать с научными материалами и широкий научный кругозор автора.

Глава Материалы и методы содержит подробное описание всех применяемых в работе реактивов и протоколов исследований.

В главе Результаты и их обсуждение представлены полученные результаты, их анализ и интерпретация, а также обсуждение с привлечением других представленных в литературе аналогичных результатов. Подробно описаны результаты исследования структуры макропористых гидрогелей на основе сополимеров хитозана с олиголактидами с помощью конфокальной лазерной микроскопии, а также некоторых физико-химических свойств, в том числе, механических характеристик и биodeградации. Кроме того, в моделях *in vitro* были исследованы цитотоксичность матриц в отношении модельных животных клеток линии мышечных фибробластов L929, а также их потенциальная иммуногенность с использованием клеток моноцитов линии THP-1. В работе также представлены результаты исследования длительного культивирования различных типов клеток на макропористых гидрогелях и дифференцировки стволовых клеток на плёнках в модели *in vitro*. Таким образом, данные, предоставленные Толстой Т.В. в главе Результате и обсуждение, исчерпывающе отражают ход проделанной работы.

В главе Заключение подведены общие итоги проделанной работы.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость. В работе Толстой Т.В. были получены новые данные о макропористых гидрогелях на основе хитозана и его сополимеров с олиго(L,L-/L,D-лактидами). В ходе исследования впервые были изучены физико-химические свойства гидрогелей, их цитотоксичность и иммуногенность. В частности, впервые было обнаружено, что баланс между гидрофильными и гидрофобными свойствами, а также скорость разложения гидрогелей, изготовленных из сополимеров хитозана с олиголактидами, определяются типом добавленного олиголактида. Впервые показано, все матрицы способствовали прикреплению, росту и пролиферации различных

типов клеток животных, в том числе мезенхимальных стромальных клеток (МСК). Кроме того, показано, что плёнки из сополимеров хитозана с олиголактидами могут влиять на способность МСК формировать костную или жировую ткань, и степень этого влияния зависит от типа добавленного олиголактида. Таким образом научная новизна работы Толстой Т.В. очевидна.

Полученные в работе результаты позволяют лучше понять, как структура и физико-химические свойства композитных матриц на основе хитозана влияют на поведение, рост и дифференцировку клеток, которые на них культивируются. Кроме того, полученные данные на основе матриц 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 Толстой Т.В. не вызывает сомнений.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов.

Диссертация Толстой Т. В. представляет собой детальное и логичное научное исследование. Автор использует современные физико-химические и молекулярно-биологические методы, такие как оптическая и конфокальная сканирующая лазерная микроскопия, проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ, метод ПЦР в реальном времени и другие. Достоверность результатов подтверждается их сходимостью и согласованностью.

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

К работе имеется ряд замечаний:

1. Стр. 36, "Добавление хитозана значительно улучшило как удлинение, так и прочность на растяжение, при этом модуль Юнга увеличился с 57.38 ± 13.21 МПа до 78.67 ± 14.15 МПа." Излишнее количество значащих цифр, если брать во внимание значения абсолютной погрешности. Корректные записи средних значений модулей Юнга с учетом абсолютной погрешности 57 ± 13 и 78 ± 14 МПа. Аналогичное замечание - Стр.51, "жесткость гидрогелей от $25,75 \pm 1,21$ до $117,82 \pm 9,83$ кПа" . Излишнее количество значащих цифр, если брать во внимание значения абсолютной погрешности. Корректные

записи средних значений жесткости гидрогеля с учетом абсолютной погрешности 26 ± 1 и 118 ± 10 кПа. Аналогичное замечание - Стр. 77. "Равновесная набухаемость макропористого гидрогеля Хит в среде DMEM составила $27,8 \pm 1,8$ мл/г после 24 ч инкубации (Рисунок 5). В случае образца макропористого гидрогеля Хит-LL степень набухания увеличилась до $31,1 \pm 3,5$ мл/г." Корректные записи средних значений набухаемости гидрогелей с учетом абсолютной погрешности 28 ± 2 и 31 ± 4 мл/г.

2. Стр.65. Формула 2 для расчета набухаемости, было бы логично рассчитывать эту величину в процентах.

3. В работе исследуются механические свойства матриц, было бы полезно уделить этому вопросу большее внимание в литературном обзоре и сравнить экспериментальные результаты с уже опубликованными данными для подобных систем.

4. Стр. 82. " $38,0 \pm 1,0$ Мпа и $3,7 \pm 0,9$ %, соответсвенно". Единица измерения - МПа.

Заключение. Перечисленные замечания не снижают научную значимость диссертации Толстовой Т.В., и в большинстве собой носят технический или рекомендательный характер. Работа выполнена на высоком научном и техническом уровне. По всем критериям, в том числе 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.

Официальный оппонент,
профессор центра фотоники
и фотонных технологий
автономной некоммерческой
образовательной организации
высшего образования
«Сколковский институт науки и технологий»,
д.х.н., профессор


Горин Дмитрий Александрович

121205, Москва, Большой бульвар д.30, стр.1,
Тел. +74952801881 (3588) E-mail: d.gorin@skoltech.ru


Руководитель отдела
Кадрового администрирования
ГУК О.С.

 Skoltech
СКОЛКОВСКИЙ ИНСТИТУТ НАУКИ И ТЕХНОЛОГИЙ

21.08.2024