

Отзыв официального оппонента на диссертационную работу
Толстой Татьяны Викторовны
«Получение и исследование в модели *in vitro* скаффолдов на основе биodeградируемых полимеров для регенеративной медицины»,
представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология

Актуальность работы

Диссертационная работа Толстой Татьяны Викторовны посвящена получению и исследованию новых перспективных биоматериалов для тканевой инженерии. Это крайне актуальная задача регенеративной медицины и трансплантологии, учитывая огромную потребность в биосовместимых и биodeградируемых материалах для замещения поврежденных или утраченных тканей и органов. Данная диссертационная работа была сфокусирована на материалах на основе сополимеров хитозана с олиголактидами (L,L-/L,D-лактидами). Получены образцы как в виде пленок, и так и макропористых гидрогелей, что позволило работать и с 2D, и 3D клеточными моделями. В диссертационной работе Толстой Т.В. были поставлены задачи, направленные на исследование физико-химических и биологических свойств полученных биodeградируемых полимеров и показаны возможности их использования для управления поведением различных типов клеток на моделях *in vitro*.

Научная новизна исследования

В работе впервые изучены основные физико-химические и биологические свойства полученных образцов биodeградируемых матриц на основе сополимеров хитозана с олиголактидами. Впервые получены данные, подтверждающие, что гидрофильно-гидрофобный баланс и кинетика биodeградации гидрогелей на основе сополимеров хитозана с олиголактидами зависят от типа привитого олиголактида. На клеточных моделях показано отсутствие цитотоксичности и выраженной иммуногенности этих биополимеров, а также их способность поддерживать

адгезию и пролиферацию линейных и первичных стромальных клеток человека и животных. Впервые установлено, что биоматериалы на основе сополимеров хитозана с олиголактидами могут оказывать разнонаправленное воздействие на дифференцировку МСК человека в адипогенном или остеогенном направлении в зависимости от типа привитого олиголактида.

Научная и практическая значимость результатов

Научная ценность работы заключается в получении принципиально новых данных о влиянии структуры, состава и физико-химических свойств биodeградируемых полимеров на основе хитозана и олиголактидов на морфологию, поведение, пролиферацию и дифференцировку клеток, культивируемых на подложках из этих полимеров или в составе трехмерных конструкций в виде гидрогелей.

Полученные данные имеют и практическое значение, поскольку обнаружена возможность управлять дифференцировкой мезенхимальных стромальных клеток в остеогенном или адипогенном направлениях за счет изменения полимерного состава матриц. Это позволяет предложить практические рекомендации по созданию эффективных биополимерных скаффолдов на основе матриц из сополимеров хитозана с олиголактидами для различных задач регенеративной медицины.

Структура и содержание диссертации

Текст диссертации построен по традиционному плану, изложен на 134 страницах, включает 18 рисунков и 5 таблиц и содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Список литературы включает 222 источника.

В разделе «Введение» автор раскрывает актуальность проблемы поиска новых биodeградируемых полимерных материалов для тканевой инженерии. В этом же разделе перечислены задачи, поставленные в исследовании, и положения, выносимые на защиту.

В разделе «**Обзор литературы**» подробно рассмотрена так называемая «триада тканевой инженерии» в виде ключевых компонентов, требуемых для создания эффективной тканеинженерной конструкции, с фокусом на важнейших свойствах полимерных матриксов и особенностях их использования для этих целей. Обсуждены основные проблемы и ограничения существующих подходов в области тканевой инженерии и разработки биоматериалов. Следует отметить, что обзор заканчивается отличным заключением, кратко подводящим итоги обсуждения современного положения дел в исследуемой области. Из обзора логично вытекает обоснование цели и задач работы.

В разделе «**Материалы и методы**» достаточно подробно описан широкий спектр современных методов, использованных в работе, что дает возможность их воспроизведения и свидетельствует о владении соискателя перечисленными методиками.

Раздел «**Результаты и их обсуждение**» включает в себя 5 глав. В первой главе подробно описаны результаты изучения структуры и физико-химических свойств полученных биodeградируемых матриксов (средний размер пор, распределение пор по размерам, набухаемость, биodeградация под действием лизоцима в модели *in vitro*, механические характеристики). В главах 2 и 3 описаны результаты исследования цитотоксичности и иммуногенности полученных матриксов на клеточных моделях. В главах 4 и 5 описаны результаты, демонстрирующие способность этих матриксов поддерживать адгезию, рост, пролиферацию и дифференцировку клеток при длительном культивировании в моделях *in vitro* с использованием нескольких линий клеток.

Весь экспериментальный материал хорошо иллюстрирован и документирован. Достоверность результатов экспериментов подтверждается использованием нескольких современных методов исследования для решения поставленных задач. Основные результаты получены автором самостоятельно.

В каждой главе также проведен анализ полученных результатов в контексте имеющихся литературных данных и интерпретированы экспериментальные данные, позволяющие сделать выводы о важном влиянии олиголактоидов на физико-химические и биологические свойства сополимерных материалов.

Выводы диссертации основаны на полученных экспериментальных результатах, сформулированы четко и ясно, соответствуют поставленным задачам и имеют достаточный уровень доказательности.

Результаты работы были доложены на нескольких отечественных и международных конференциях и опубликованы в 18 печатных работах, в том числе в четырех статьях в журналах, индексируемых в наукометрических базах данных Scopus и/или Web of Science и входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертаций. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

К общим достоинствам диссертационной работы следует отнести хорошее владение современной информацией в выбранной сложной междисциплинарной области исследований, высокий методический уровень исследований с использованием релевантных экспериментальных подходов, как физико-химических, так и биологических, примененных для решения поставленных в работе задач. Необходимо также отметить последовательное, логичное и ясное изложение полученных результатов и их всестороннее обсуждение с использованием данных актуальных литературных источников.

При общей высокой оценке диссертационной работы Т.В. Толстой хочется выделить некоторые замечания и рекомендации:

1. В диссертационной работе прекрасно подготовлен обзор литературы, посвященный различным проблемам тканевой инженерии и обосновывающий необходимость разработки новых биоматериалов для этой области. Однако необходимо отметить, что при описании клеточных компонентов тканеинженерных конструкций упомянуты преимущественно

стволовые клетки, в то время как достаточно много примеров использования специализированных клеток для этой цели. В подразделе про клеточную терапию и стволовые клетки почему-то описаны плюрипотентные стволовые клетки и мезенхимные стволовые клетки, а про остальные типы мультипотентных стволовых клеток, к которым относятся и МСК, в этом разделе нет ни слова. Кроме того, нарушена общая логика изложения в главе 1.1.4 «Триада тканевой инженерии»: сначала диссертант пишет про стволовые клетки как источник материала для тканевой инженерии, потом про бесклеточные подходы, а затем снова про постнатальные стволовые клетки («взрослые стволовые клетки»). Обоснование такой последовательности изложения материала не очень понятно.

2. В разделе 3.1.1 результатов указано, что «во всех исследованных образцах гидрогелей размер пор являлся оптимальным для роста и пролиферации клеток». Насколько корректно и доказательно такое утверждение для всех типов клеток?

3. Хотелось бы уточнить, как диссертант может объяснить установленные различия в морфологии и адгезии клеток мышинных фибробластов и МСК к пленкам и поверхности пор гидрогелей биоматериалов на основе хитозана и его сополимеров и как это можно связать с образованием сфероидов в экспериментах по остеогенной дифференцировке МСК? Так, в культуре линейных мышинных клеток, культивируемых на пленках их хитозана, наблюдали много прикрепленных клеток сферической формы, в то время как для гидрогелей такие клетки наблюдали преимущественно для сополимеров хитозана с олиголактидами. Схожая картина наблюдалась для МСК. В диссертации в обсуждении этих результатов упомянуты общие рассуждения о разнице в гидрофильно-гидрофобном балансе сополимеров хитозана с L,D-олиголактидом, однако нет предположений о конкретных механизмах выявленных различий в клеточном поведении.

4. В продолжение предыдущего вопроса хотелось бы более подробного обсуждения возможных механизмов усиления пролиферативного потенциала стромальных клеток в образцах гидрогелей на основе хитозана.

5. На рис. 5 (автореферат) и 8 (диссертация) приведен график по уровню жизнеспособности клеток в %, на котором представлен один из результатов, превышающий 100%, что противоречит формальной логике. Ниже из описания результатов можно понять, что это данные относительно контроля, что объясняет такое несоответствие, однако тогда это должно быть отражено на рисунке и в подрисуночной подписи.

6. На стр. 23 автореферата и стр. 108 диссертации указано, что «матрицы на основе Хит и Хит-LL поддерживали, а образцы Хит-LD даже усиливали адиподифференцировку МСК в модели *in vitro*», хотя это не соответствует представленным экспериментальным данным (матрицы Хит-LL обладали преимуществом в отношении стимуляции адипогенной дифференцировки МСК). Вероятно, это опечатка.

7. В диссертации отсутствует раздел описания методов статистической обработки и анализа полученных данных, хотя в результатах приведены данные по сравнению количественных показателей между экспериментальными образцами биоматериалов. Кроме того, ни в разделе «Материалы и методы», ни в подрисуночных подписях не указано, какое количество образцов было исследовано в каждом эксперименте, какое количество технических повторов выполнено, что затрудняет восприятие.

Вместе с тем, указанные замечания носят рекомендательный характер и не умаляют высокой значимости диссертационного исследования.

Заключение

Диссертационная работа Толстовой Татьяны Викторовны «Получение и исследование в модели *in vitro* скаффолдов на основе биodeградируемых полимеров для регенеративной медицины», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 - Биотехнология, является законченной научно-квалификационной

работой, выполненной на высоком уровне. Результаты работы оригинальны, обладают как научной, так и практической значимостью, а высокая квалификация соискателя не вызывает сомнений. Содержание диссертации адекватно отражено в автореферате. На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Гостовой Т.В. полностью соответствует критериям, установленным п.9 «Положения о присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (с актуальными изменениями и дополнениями), предъявленным к диссертациям на соискания ученой степени кандидата наук, а ее автор, Толстова Татьяна Викторовна, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 - Биотехнология.

Официальный оппонент:

Кандидат медицинских наук, доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины, заведующий лабораторией репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», обособленного подразделения Медицинского научно-образовательного центра Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Почтовый адрес организации: 119192, Москва, Ломоносовский пр. 27 корп. 10.

Телефон: +79166773257 (моб.)

E-mail: efimenkoay@my.msu.ru

Анастасия Юрьевна Ефименко

Дата 17.05.2024

Подпись Ефименко А.Ю. заверяю

Ученый секретарь МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова

Орлова Я.А.

