

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Кудан Елизаветы Валерьевны на диссертационное исследование Кондратенко Альбины Александровны «Биодеградируемый матрикс на основе децеллюляризованной пуповины человека для заживления полнослойных ран кожи (экспериментальное исследование)», представленное на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 3.1.14 – трансплантология и искусственные органы, 3.3.3 – патологическая физиология

Актуальность темы научного исследования

Методы аутологичной и аллогенной трансплантации кожи могут быть использованы для закрытия полнослойных ран. Перфорированный для увеличения площади кожный лоскут позволяет не только возместить объем утраченной ткани, но и способствует исключению инфекционных осложнений и стимуляции восстановления. Однако ограниченность резервов использования полнослойной кожной пластики побуждает исследователей к поиску альтернативных стратегий пересадке ауто- и аллогенных кожных трансплантатов.

Среди возможных терапевтических подходов для закрытия повреждения кожи и стимуляции ее регенерации перспективным представляется применение продуктов тканевой инженерии, изготовленных из децеллюляризованных органов и тканей человека и животных. Присутствие биомиметика внеклеточного матрикса способствует повышению в ране концентрации биоактивных молекул, и, соответственно, создает благоприятные условия для миграции собственных клеток реципиента. Отмечу, что со временем происходит биодеградация материала, выполнившего свои функции.

Биоматериал провизорных органов человека имеет высокий потенциал использования в регенеративной медицине, обусловленный их уникальным компонентным составом: коллагены разных типов, несulfатированные и sulfатированные гликозаминогликаны, фибронектин, многочисленные факторы роста (трансформирующий фактор роста альфа и различные изоформы трансформирующего фактора роста бета, тромбоцитарный фактор роста, фактор роста фибробластов, фактор роста эндотелия сосудов и др.). Данный аллогенный биоматериал отличается отсутствием возрастных изменений внеклеточного матрикса. Важным преимуществом использования пуповины является отсутствие этических ограничений, так как внеэмбриональные ткани, как правило, утилизируются после родов как биологические отходы. Изготовленный из пуповины продукт ожидается, что сохранит молекулы клеточной адгезии и факторов роста, что может изменить выраженность стадий воспалительного процесса - альтерации, сосудистых и клеточных реакций, пролиферации, способствуя ускорению формирования грануляционной ткани, эпителизации и регенеративному типу заживления.

Таким образом, исследование в области регенеративной медицины, а именно, разработка и исследование безопасности и эффективности биодеградируемого матрикса из децеллюляризованной пуповины человека, предназначенного для заживления глубоких повреждений кожи, является актуальной задачей для трансплантологии и патологической физиологии.

Научная новизна исследования

В работе впервые разработан лабораторный регламент изготовления матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня, обеспечивающий эффективное удаление клеток и сохранение структуры внеклеточного матрикса пуповины человека. Проведены исследования морфологии матриксов, изготовленных с использованием разных протоколов, а также исследования их состава и цитотоксичности. Установлено, что применение ферментативного гидролиза солянокислым пепсином децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека уменьшает содержание гликозаминогликанов и

оказывает негативное влияние на способность матрикса поддерживать метаболическую активность фибробластов дермы человека. Показано, что биodeградируемый матрикс из децеллюляризованной пуповины способен к набуханию более, чем в 16 раз, а также содержит коллаген IV типа, ламинин, фибронектин и трансформирующий фактор роста TGF- β 3. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* доказана биосовместимость матрикса и его функциональная активность для заживления глубоких повреждений кожи.

Практическая значимость работы

Разработка протокола децеллюляризации Вартонова студня, обеспечивающего достаточное удаление клеток и генетического материала донора, а также позволяющего сохранить нативную структуру внеклеточного матрикса и регенеративный потенциал пуповины человека, могут стать основой для разработки раневого покрытия, стимулирующего регенерацию глубоких повреждений кожи и мягких тканей. Лиофилизированный матрикс может быть использован в качестве самостоятельного медицинского изделия при лечении полнослойных ран кожи. Также матрикс из децеллюляризованной пуповины может стать основой для разработки *in vitro* тканеинженерных биоэквивалентов тканей.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций

Диссертационная работа выполнена на достаточном количестве экспериментального материала. Сформулированные задачи полностью соответствуют поставленной цели, а основные научные положения, выводы соответствуют цели и задачам работы. В диссертации использованы современные методы исследований, включая сканирующую и трансмиссионную электронную микроскопию, биохимические, иммуногистохимические и культуральные методы исследования. Отметим, что оценка функциональной активности полученного матрикса была проведена на экспериментальных моделях *in vivo*. Анализ полученных данных выполнен с применением

общепринятых статистических методов. Работа иллюстрирована таблицами, схемами, микрофотографиями и графиками. Материалы исследования изложены в 16 научных трудах и были доложены на всероссийских и международных конференциях.

Оценка содержания и завершенности диссертации

Диссертация Кондратенко А.А. написана в классическом стиле на 142 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения и трех глав (глава 1 «Обзор литературы», глава 2 «Материалы и методы», глава 3 «Результаты и обсуждение»), заключения, выводов, практических рекомендаций, списка основных сокращений, списка литературы и приложения. Диссертация содержит 4 таблицы, 58 рисунков и одну формулу. Список литературы включает 166 источников (50 отечественных и 116 зарубежных).

Введение содержит все необходимые разделы – обоснование актуальности исследований, его научную новизну и практическую значимость, сформулированы цель и задачи работы, основные положения, выносимые на защиту, а также описана методология и основные методы исследования.

В Главе 1 «Обзор литературы» приводится краткое описание роли компонентов внеклеточного матрикса в процессе заживления кожных ран, а также подходов тканевой инженерии к восстановлению повреждений с использованием матриксов, полученных путем децеллюляризации тканей человека и животных. Приводится систематический обзор опубликованных в литературе данных, посвященных использованию децеллюляризованной пуповины человека для стимуляции восстановления разных тканей. Описана возможность его применения в качестве источника биоактивных молекул при культивировании клеток, клеточной иммунотерапии, заживлении ран, трансплантации гемопоэтических клеток, направленной дифференцировки клеток. Подробно представлены примеры экспериментальных исследований эффективности применения децеллюляризованной пуповины человека и показана возможность использования биосовместимых и биоактивных

продуктов на ее основе. Изложен анализ преимуществ и недостатков использования разных видов экспериментальных моделей исследований ранозаживления.

В главе 2 «Материалы и методы» подробно изложена технология децеллюляризации пуповины человека и методы оценки эффективности удаления клеток. Описаны методы оценки морфологии полученных бесклеточных матриксов, содержания в них гликозаминогликанов и их цитотоксичности на клетках дермы человека. Изложены методики исследования способности матрикса к биодegradации и набуханию. Достаточно основательно описана культуральная работа по оценке биосовместимости матрикса *in vitro*. Описаны использованные модели для оценки функциональной эффективности матрикса *in vivo*. Все использованные методы исследования являются адекватными и высокоинформативными. Методы статистической обработки позволяют объективно оценить полученные результаты.

Глава 3 «Результаты и обсуждение» отражает результаты проведенной работы. Автором представлены данные, доказывающие эффективность примененного режима децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека. Обоснован выбор способа изготовления матрикса на основе децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека. Показано, что применение этапа ферментативного гидролиза солянокислым пепсином приводит к статистически значимому снижению содержания гликозаминогликанов в матриксе и снижению метаболической активности фибробластов дермы человека, культивированных в «вытяжке» из матрикса на основе децеллюляризованного Вартонова студня. Описаны результаты сравнения морфологии поверхностей матриксов, изготовленных по разным технологиям. Подробно изложены результаты исследований состава матрикса, изготовленного без применения этапа ферментативного гидролиза пепсином, полученные методами гистологического, иммуногистохимического исследования и анализа спектров инфракрасной спектроскопии с Фурье

преобразованием. Данные, полученные в результате изучения влияния матрикса на рост и жизнеспособность клеток, подтвердили цитосовместимость матрикса *in vitro*. Исследования функциональной активности на моделях полнослойных ран кожи животных *in vivo* подтверждают ранозаживляющие свойства бесклеточного матрикса из пуповины человека.

В главе **Заключение** кратко изложены основные результаты работы, проведен анализ полученных данных и подведен итог всех этапов исследования. Выводы являются итогом проведенных исследований и логично вытекают из результатов. Практические рекомендации четко сформулированы и обоснованы полученными результатами. Приложение содержит лабораторный регламент получения и оценки матрикса на основе децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека.

Замечания по содержанию и оформлению диссертационной работы

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертационной работы Кондратенко А.А. нет.

В процессе рассмотрения диссертационной работы возникло несколько вопросов, имеющих не столько критический характер, сколько уточнение стратегии выбора направления исследования и его дальнейшего развития.

1. Автором проведено исследование регенеративного потенциала матрикса из децеллюляризованной пуповины человека при лечении полнослойных ран кожи, вызванных механическим повреждением. По мнению автора, будет ли эффективным использование такого матрикса при лечении полнослойных ран кожи, вызванных ожогами, обморожениями, заболеваниями кожи, такими как буллёзный эпидермолиз?

2. Почему для высвобождения факторов роста был выбран именно протокол ферментативного гидролиза солянокислым пепсином? Были ли протестированы протоколы, основанные на применении других ферментов или ферментативных комплексов (например, панкреатина)?

3. Чем, по мнению автора, вызвано снижение метаболической активности фибробластов человека, подвергшихся действию вытяжки из матрикса,

приготовленного с применением ферментативного гидролиза солянокислым пепсином?

Замечание:

На рисунках 16-18 размерная шкала практически не видна. Возможно, стоило бы ее нарисовать на самом изображении.

Подтверждение опубликований основных результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертационной работы отражены в 16 публикациях, среди них 6 статей в научных журналах и 10 тезисов докладов, доложенных на тематических конференциях. Также автором получен патент РФ на изобретение. Опубликованные научные работы полностью отражают основное содержание диссертационной работы Кондратенко А.А.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями, предъявляемыми к авторефератам, в кратком изложении содержит все основные результаты диссертационной работы. Автореферат в полном объеме отражает содержание диссертационной работы. Принципиальных замечаний нет.

Заключение

Диссертационная работа Кондратенко Альбины Александровны на тему «Биодеградируемый матрикс на основе децеллюляризованной пуповины человека для заживления полнослойных ран кожи (экспериментальное исследование)» является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена задача, имеющая научно-практическое значение для трансплантологии и патологической физиологии: разработка и экспериментальное исследование биодеградируемого матрикса для заживления полнослойных ран кожи.

По своей актуальности, научной новизне и практическому значению диссертация Кондратенко Альбины Александровны соответствует

требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук согласно требованиям п.17 «Положения о присуждении ученых степеней в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации», утвержденным приказом директора от 12.02.2021 №70/8, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук и соответствует специальностям: 3.1.14 – трансплантология и искусственные органы, 3.3.3 – патологическая физиология, а сама автор Кондратенко А.А. достойна присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Ведущий эксперт научного проекта
научно-образовательного центра
биомедицинской инженерии
ФГАОУ ВО «Национальный
исследовательский технологический
университет «МИСИС»
д.б.н.

Е.В. Кудан

Подпись д.б.н. Кудан Е.В. «заверяю»:

Проректор по безопасности и общим
вопросам ФГАОУ ВО «Национальный
исследовательский технологический
университет «МИСИС»
к.т.н.



И.М. Исаев

«25» октября 2023 г.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС».

Почтовый адрес: 119049, г. Москва, Ленинский пр-кт, д. 4, стр. 1
Телефон: +7 (495) 237-22-22
Электронная почта: personal@misis.ru
Адрес в сети интернет: www.misis.ru