

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Кирпатовского Владимира Игоревича 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

Совершенствование методов лечения глубоких повреждений кожи по-прежнему остается актуальной задачей современной биомедицины. Не всегда возможно закрыть зону дефекта средствами, традиционно применяемыми в клинической практике. Покрытие раны тканеинженерными эквивалентами кожи может стать альтернативой ее трансплантации.

Создание *in vitro* биоэквивалентов для восстановления структуры и/или функций поврежденных органов и тканей с использованием биомиметиков внеклеточного матрикса, клеток и факторов роста является одной из задач тканевой инженерии. Биодеградируемые тканеинженерные конструкции не только могут быть использованы для обеспечения физической защиты поврежденных тканей, но и способны к длительному высвобождению биоактивных молекул, стимулирующих неоваскуляризацию и эпителизацию. При этом также показано, что сами бесклеточные матриксы способны стимулировать процессы регенерации за счет сохранения в них биоактивных молекул и способности формировать «ниши» для врастающих из окружающих тканей клеток.

К одним из наиболее перспективных матриксов относят продукты, полученные методами децеллюляризации органов и тканей в связи с их высокой биосовместимостью, подходящей для миграции клеток пористой структурой и сохранением необходимых для стимуляции регенерации компонентов матрикса. При этом часто используемый в исследованиях аллогенный или ксеногенный материал обладает определенными недостатками, связанными с ограниченной доступностью, возможными возрастными изменениями свойств и сложностью технологической обработки. Выбранный диссертантом вариант источника для получения децеллюляризованного матрикса Вартонова студня пуповины в этом плане имеет существенные преимущества: он легко доступен, его структура не

требует сложной обработки, а также он насыщен глюкозаминогликанами и факторами роста, которые могут обеспечить ожидаемый функциональный эффект. Отсутствие необходимости в инвазивных процедурах при получении пуповины человека и этических ограничений для использования данного аллогенного биоматериала является дополнительным преимуществом его использования при создании бесклеточного матрикса. Однако, исследований по возможному использованию бесклеточных тканевых препаратов, изготовленных из Вартонова студня пуповины человека, немного (даже в зарубежной литературе), а технология их изготовления до конца не разработана.

Исследованию этих малоизученных вопросов посвящена диссертация А.А.Кондратенко, что определяет актуальность данного исследования.

Научная новизна исследования

Новизна проведенного автором исследования обусловлена разработкой лабораторного регламента простого и эффективного протокола децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека с использованием замораживания/отогрева материала, обработкой перекисью водорода и детергентом и последующей лиофилизацией полученного бесклеточного материала для получения конечного продукта, а также получением доказательств его биологической эффективности. Диссертантом проведен анализ сохранности в полученном продукте биологически активных молекул, определяющих его функциональные свойства, включая определение гликозаминогликанов, коллагена IV типа, ламинина, фибронектина и трансформирующего фактора роста TGF β 3, а также проведена оценка его потенциальной цитотоксичности и влияния на пролиферацию клеток в опытах *in vitro* на культурах клеток. При этом были использованы клетки различного происхождения – фибробласты человека и клетки из разных органов лабораторных животных (свиней морских свинок, крыс и мышей) с целью оценки потенциального влияния видовых различий.

Также впервые оценены такие биологические свойства матрикса, как объемообразование при нанесении лиофилизированной субстанции на раневую поверхность для оценки адекватности ее покрытия, динамика его резорбции в организме а также определено ее влияние на процесс заживления в модели полнослойной кожной раны в хроническом эксперименте на разных лабораторных животных (мыши, свинья), что доказывает эффективность использования данного матрикса для стимуляции заживления глубоких ран.

Практическая значимость работы

Разработанная технология изготовления бесклеточного матрикса из пуповины человека является основой для создания биodeградируемого медицинского изделия, обладающего влагопоглощающими свойствами, стимулирующего регенерацию поврежденной кожи и мягких тканей, а также для использования его в качестве носителя при производстве биоэквивалентов тканей *in vitro*.

Применение разработанного биodeградируемого матрикса предоставит возможность ускорить заживление и качество оказания медицинской помощи пациентам с обширными ранами кожи.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций

Диссертационное исследование Кондратенко А.А. построено логично, примененные методы лабораторных и экспериментальных исследований соответствуют обозначенным целям и задачам работы. Статистический анализ полученных, на достаточном объеме исследований данных, проведен согласно общепринятым стандартам. Выводы, сформулированные в результате анализа данных собственных исследований, обоснованы. Работа изложена в доступной форме с использованием фотографий, таблиц, схем и графиков. По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ. Научная обоснованность и значимость работы показана на конференциях всероссийского и международного уровня.

Оценка содержания и завершенности диссертации

Диссертация Кондратенко А.А. построена по традиционному плану, включает введение, обзор литератур, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы и приложение. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы, 58 рисунков и одну формулу. Список литературы включает 166 источников (50 отечественных и 116 зарубежных).

Введение в достаточной мере раскрывает актуальность, научную новизну и практическую значимость исследования. Сформулированы цель и задачи,

основные положения, выносимые на защиту, а также кратко описана методология исследования.

В Главе 1 автором систематизирована информация об исследованиях, посвященных изучению потенциала использования децеллюляризованной пуповины человека для восстановления тканей, а также в качестве источника факторов роста, иммунотерапии и направленной дифференцировки клеток. Изложены протоколы получения продуктов на основе децеллюляризованной пуповины человека, которые использовали авторы опубликованных источников. Описаны модели для испытаний свойств продуктов, влияющих на заживление. Специальный раздел посвящен анализу данных литературы по изучению способности децеллюляризованного материка из Вартонова студня пуповины человека стимулировать регенерацию различных клеток, свидетельствующему об ограниченном количестве таких исследований и их отсутствие в отношении влияния на заживление кожных ран. Относительным замечанием является то, что этот раздел написан по типу мета-анализа, используемого в статьях, но не в литературном обзоре диссертационной работы.

Обзор полностью раскрывает современное состояние проблемы, рассматриваемой диссертации, но обычно его заканчивают кратким заключением с обоснованием целесообразности проведения данного исследования

Глава 2 «Материалы и методы» посвящена изложению технологий изготовления тканеинженерных продуктов из децеллюляризованной пуповины человека. Описаны методики оценки остаточного содержания клеток и ДНК в матриксе после процесса децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека. Автор изложила методы, которые были использованы ею для оценки морфологических свойств полученных матриксов, а именно методы электронной микроскопии, инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье, гистохимические и иммуногистохимические методы окрашивания. Описан метод количественного определения содержания сульфатированных гликозаминогликанов в матриксах, полученных по двум технологиям. Изложены методы анализа цитотоксичности, способности матрикса впитывать влагу и к биodeградации. Представлен дизайн оценки биосовместимости матрикса *in vitro* и его функциональной активности *in vivo*. Указаны методы статистического анализа, используемые при проведении исследования.

Все использованные автором методы исследования и методы их обработки полностью обоснованы и адекватны поставленным задачам

Глава 3 «Результаты и обсуждение» посвящена изложению результатов собственных исследований автора.

Изложены и проиллюстрированы данные, демонстрирующие качество децеллюляризации пуповины человека. Продемонстрировано и подтверждено статистически, что включение дополнительного этапа ферментативного гидролиза солянокислым пепсином приводит к уменьшению содержания сульфатированных гликозаминогликанов, изменению микроструктуры матрикса и негативному влиянию на метаболическую активность фибробластов кожи человека. Доказана полнота удаления клеточных элементов из Вартонова студня без использования этапа обработки пепсином при сохранении основных компонентов внеклеточного матрикса, включая глюкозаминогликаны, коллаген, ламинин, фибронектин, а также факторы роста.

Представлены результаты изучения биосовместимости матрикса *in vitro* и исследований функциональной активности на моделях животных *in vivo*. При этом получены интересные данные об особенностях влияния экстракта из децеллюляризованного матрикса Вартонова студня пуповины, на жизнеспособность и пролиферативную активность культивируемых клеток различных органов лабораторных животных и выявлены определенные различия в этом влиянии, в частности, повышение пролиферативной активности клеток головного мозга свиньи и кожи мышей, а также жизнеспособности клеток головного мозга морских свинок и кожи мышей при отсутствии достоверных различий в отношении этих показателей для клеток других органов.

Убедительно доказано положительное влияние матрикса на заживление кожной раны как в отношении неоваскуляризации и роста грануляционной ткани, так и в скорости восстановления эпителиальной выстилки раневой поверхности.

Заключение по диссертации написано очень кратко, но в тезисном виде обобщает полученные автором результаты.

Выводы являются следствием выявленных в результате анализа полученных данных собственных исследований, соответствуют цели и задачам диссертации и полностью обоснованы.

Практические рекомендации также обоснованы и могут быть полезны при дальнейшей разработке возможностей использования децеллюляризованного матрикса Вартонова студня с целью стимуляции заживления кожных ран.

Приложение является лабораторным регламентом получения и оценки матрикса из 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 ней представлены чрезвычайно интересные данные, которые могут быть в дальнейшем предметом обсуждения. В частности:

1. Не предполагали ли Вы изучить влияние бесклеточного матрикса с заселенными в него аутологичными низкодифференцированными клетками, например мезенхимными стволовыми/прогениторными клетками жировой ткани?.

2. Нет ли у Вас предположений о механизме разного действия бесклеточного матрикса Вартонова студня на жизнеспособность и пролиферацию разных культивируемых клеток, выделенных от разных животных?

Подтверждение опубликований основных результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертационной работы Кондратенко А.А. изложены в 16 публикациях, среди них 6 статей в рецензируемых научных журналах и 10 тезисов. Получен патент РФ на изобретение.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

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

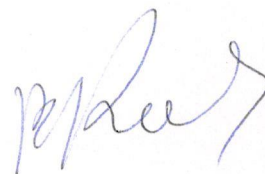
Заключение

Диссертационная работа Кондратенко А.А. на тему «Биодеградируемый матрикс на основе децеллюляризованной пуповины человека для заживления полнослойных ран кожи (экспериментальное исследование)» представляет собой законченное научно-квалификационной исследование, в котором решена важная научно-практическая задача, а

именно, изготовление матрикса для заживления полнослойных ран из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека.

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.

Главный научный сотрудник НИИ
урологии и интервенционной
радиологии им. Н.А.Лопаткина –
филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России
д.м.н., профессор



Кирпатовский В.И.

Подпись д.м.н., профессора Кирпатовского В.И. «заверяю»:

Ученый секретарь
НИИ урологии и интервенционной
радиологии им. Н.А.Лопаткина –
филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России
к.м.н.



Никушина А.А.

«25» 10 2023 г.

Научно-исследовательского института урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Почтовый адрес: 105425, Москва, ул. Парковая 3-я, 51, стр.4

Телефон: +7 (499) 110-40-67

Электронная почта: call@niiuro.ru

Адрес в сети интернет: www.uroline.nmicr.ru