

ОТЗЫВ

официального оппонента – доктора биологических наук, Перовой Надежды Викторовны на диссертацию Островского Дмитрия Сергеевича «Разработка способов конструирования искусственной роговицы на основе 3D клеточных сфероидов и полимерных материалов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 14.03.03 – патологическая физиология и 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы.

Экспериментальная работа, выполненная Островским Д.С., посвящена одной из самых сложных проблем человечества – создание функционального протеза роговицы. Дефицит донорского материала требует поиска новых путей решения данной проблемы. Несмотря на большое количество работ, посвященных данному вопросу, он до сих пор является весьма актуальным в современной трансплантологии и биоинженерии. Поиск перспективных направлений в области искусственных материалов, соединение этих направлений с новыми клеточными технологиями, которые до недавнего времени были невозможны из-за отсутствия законодательной базы чрезвычайно интересны и перспективны.

Научной новизны данной работе добавляет оригинальная методика выделения клеточной культуры кератоцитов, которая позволила увеличить количество и жизнеспособность получаемых клеток из стромы роговицы.

Впервые была показана возможность формирования 3D клеточных культур из клеток заднего эпителия роговицы и продемонстрированы их морфо-функциональные особенности, демонстрирующие сохранность эпителиального фенотипа, а именно наличие экспрессии маркера ZO-1 и Na/K АТФазы. На основании достаточного количества экспериментов было показано, что добавление L-аскорбиновой кислоты в полную питательную среду стимулирует синтез внеклеточного матрикса, а именно коллагена 1,3,5 и 6 типов, 3D культурой кератоцитов, что дает возможность формировать полноценную структуру роговицы в объеме.

Диссертация построена в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов, результатов собственных

исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Использовано 257 источников, из них 18 отечественных и 239 иностранных. Вся диссертация занимает 145 страниц, содержит 19 таблиц и 55 рисунка.

Во введении приводится краткое описание актуальности исследования, сформулированы цель и задачи работы, научная новизна и практическая значимость, положения выносимые на защиту.

Обзор литературы занимает 23 страницы и посвящен в первом разделе описанию строения роговицы. Однако это не переписывание учебника анатомии, а полноценный анализ слоев роговицы с функциональными особенностями архитектоники и функционированием клеток на любом из этапов жизненного цикла. Что делает понятным направление экспериментальной работы.

Второй раздел достаточно краток и посвящен материалам, примененным в исследования, где автор делает выбор в сторону фиброина шелка, полученного от шелкопряда.

В главе «Материалы и методы экспериментальных исследований» описана общая характеристика экспериментального материала, методы статистической обработки полученных результатов. Подробно изложена методика выделения и культивирования кератоцитов и клеток заднего эпителия роговицы, поэтапно приведен протокол подбора полной питательной среды как для 2D, так и для 3D клеточного культивирования. Описана методика проведения иммуногистохимического исследования, анализа жизнеспособности методом проточной цитофлуориметрии и «ДНК-комет».

Выбор материалов и методов исследования полностью соответствует поставленной цели исследования и позволяет реализовать поставленные задачи. Методы соответствуют современному уровню развития науки, описаны достаточно подробно.

В главе «Результаты» автором был представлен оригинальный протокол выделения и культивирования кератоцитов, обеспечивающий получение большего количества жизнеспособных клеток, а также поддержание их пролиферативной активности. Представлены результаты подбора полной питательной среды для 2D и 3D культивирования, которое позволяет сохранить морфологические и функциональные особенности клеточных культур. Проведена большая работа по сравнению морфофункциональных параметров изучаемых 2D и 3D клеточных культур на разных сроках культивирования и в разных питательных средах.

По результатам анализа проведенных исследований убедительно доказано, что разработанная оригинальная методика выделения кератоцитов, позволяет увеличить получение жизнеспособных клеток, а культивирование в подобранной полной культуральной среде сохранить их морфологические особенности. В то же время в данной работе показана возможность получения жизнеспособной клеточной культуры заднего эпителия роговицы и получение из них 3D клеточных сфероидов с сохранением их функциональных и морфологических особенностей. Представлены результаты оценки пролиферативной активности кератоцитов при их совместном культивировании с отобранными полимерными материалами и показано, что наибольшая клеточная активность наблюдается на фиброине шелка.

Важным разделом в работе Островского Д.С. стал подбор оптимального полимерного материала для создания слоистой структуры стромы роговицы. Но именно этот раздел заслуживает наибольших замечаний. В работе было показано, что фиброин шелка в полной мере соответствует требованиям необходимым для создания стромы искусственной роговицы: сохранение прозрачности, высокая биосовместимость и регулируемая биodeградируемость. Слишком вольное обращение с терминами биосовместимость, биodeградируемость и токсичность. Автор делает выводы о материале, основываясь только на

экспериментах *in vitro* с клеточными культурами без отнесения к целому организму. В введении автор ссылается на паутинную нить, в обзоре литературы на нить шелкопряда. В разделе материалы и методы просто ссылка на полимер из лаборатории. В экспериментальной работе это можно принять как однородный полимер, но следует отметить, что паутинный материал не имеет разрешений применения на человеке. И в дальнейшей работе, когда пойдет речь о создании ткане-инженерной конструкции для человека уже более взвешенно подходить к выбору материала и его производителя.

Но все же автором была показана возможность культивирования фиброина шелка в комбинации с 3D клеточными сфероидными кератоцитами, позволяющей создать структуру, приближенную к эквиваленту стромы роговицы, что делает замечания, сделанные ранее менее значимыми перед результатами работы. Замечания носят не принципиальный характер и не влияют на прохождение процедуры защиты диссертации.

Сильной стороной работы является клеточная составляющая, выполненная на очень высоком профессиональном уровне. Выводы сделаны на достаточно большом материале, имеющем статистическую достоверность.

В заключении диссертантом четко изложены основные положения диссертационной работы, обсуждаются результаты исследования с позиции сравнения с работами зарубежных авторов.

Выводы исследования логически вытекают из анализа полученных результатов, обоснованы и полностью соответствуют поставленным задачам.

Диссертационная работа изложена понятным литературным языком, несмотря на большое количество профессиональных терминов. Особо хочется отметить автореферат, который дает полностью представление о глубине экспериментальной работы и полностью соответствует содержанию диссертационной работы и который написан хорошим понятным даже для непрофессионала языком, что характеризует автора как профессионально состоявшегося специалиста. .

По теме исследования опубликовано 9 научных статей, 4 из которых в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ (2 в базе данных Scopus).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Островского Дмитрия Сергеевича на тему «Разработка способов конструирования искусственной роговицы на основе 3D клеточных сфероидов и полимерных материалов» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований содержатся новое решение актуальной задачи – создание искусственной роговицы на основе полимерных материалов и 3D клеточных культур кератоцитов и клеток заднего эпителия роговицы.

Результаты исследования имеют большое значение для трансплантологии, офтальмологии и клеточной биологии.

Диссертация соответствует требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации №335 от 21 апреля 2016 г.), а ее автор, Островский Дмитрий Сергеевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 14.03.03 – патологическая физиология и 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы.

Заместитель директора по научно-практической работе
АНО «Институт медико-биологических исследований
и технологий»
д.б.н.

Н.В. Перова

«14» 02 2019 г.

Юридический адрес и почтовый адрес:
123557, г. Москва, Б. Тишинский пер., д. 43/20, стр.2.
Тел.: +7(499) 252-24-22
Электронная почта: post@imbiit.com
Адрес сайта: <http://www.imbiit.com>

Подпись Перовой Н.В. заверяю директор АНО «ИМБИИТ», профессор В.И. Севастьянов

