

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
Федерального государственного
бюджетного учреждения
«Государственный научный центр
Российской Федерации –
Федеральный медицинский
биофизический центр имени А.И.
Бурназяна» ФМБА России
профессор РАН

Самойлов А.С.

« 20 » февраля 2019 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России о научно-практической значимости диссертации Островского Дмитрия Сергеевича на тему «Разработка способов конструирования искусственной роговицы на основе 3D клеточных сфероидов и полимерных материалов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 14.03.03 – патологическая физиология и 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы (биологические науки)

Актуальность темы научного исследования

Проблема заболеваний роговицы остается одной из основных причин слепоты во всем мире. Традиционные методы лечения сквозной или послойной кератопластики с использованием трупного донорского материала, либо кератопротезирование в тяжелых случаях имеют ограничения - дефицит трупного донорского материала, развитие отторжения кератопротеза. Использование искусственной роговицы позволит преодолеть проблемы тканевой несовместимости и добиться благоприятного результата при кератопластиках высокого риска осложнений.

Представленная диссертационная работа Островского Дмитрия Сергеевича на тему «Разработка способов конструирования искусственной роговицы на основе 3D клеточных сфероидов и полимерных материалов» посвящена

решению одной из важнейших проблем офтальмологии – разработке нового способа создания искусственной роговицы, а именно созданию технологии, обеспечивающей сохранение морфофункциональных особенностей роговицы.

На современном этапе развития медицины имеется множество работ, направленных на создание искусственной роговицы, однако имеющиеся работы в основном базируются на применении 2D клеточных культур кератоцитов. Однако несмотря на имеющиеся положительные результаты известно, что при 2D культивирование кератоцитов происходит постепенное изменение их фенотипа и трансформация в миофибробласты. Данное обстоятельство приводит к нарушению синтеза организованного внеклеточного матрикса и развитию помутнения искусственной роговицы. В этой связи крайне актуальным вопросом является сохранения фенотипа и функциональной особенности кератоцитов. Одним из перспективных направлений позволяющим решить данную проблему, является использование 3D клеточных сфероидов. Следует отметить, что в ряде работ отмечается использование 3D клеточных сфероидов кератоцитов для реконструкции небольшого фрагмента роговицы, однако использования исключительно клеточного компонента ограничено необходимостью сохранения оптических характеристик искусственной роговицы. Одним из путей решения данной проблемы является применением полимерных материалов для получения искусственной роговицы, однако до сих пор отсутствует единое мнение относительно наиболее оптимального материала для создания искусственной роговицы. Поэтому поиск способов конструирования искусственной роговицы на основе 3D клеточных сфероидов и полимерных материалов является своевременным и актуальным.

Связь с планом научных исследований

Диссертация Островского Д.С. на тему: ««Разработка способов конструирования искусственной роговицы на основе 3D клеточных сфероидов и полимерных материалов» выполнена в соответствии с тематикой и планом научной деятельности Федерального государственного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

Работа соответствует специальностям 14.03.03 – патологическая физиология, 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы.

Новизна исследования, выводов и рекомендации, сформулированных в диссертации

Работа Островского Д.С. является научным исследованием, посвященным поиску и экспериментальному обоснованию новых способов конструирования искусственной роговицы на основе 3D клеточных сфероидов и полимерных материалов. В процессе выполнения диссертационной работы впервые предложена оригинальная методика выделения кератоцитов роговицы человека, которая в отличие от имеющейся на сегодня методики позволяет получить большее количество жизнеспособных клеток. При этом предлагаемая оригинальная методика является менее трудоемкой, что также безусловно повышает ее значимость.

Выполненная работа имеет фундаментальный характер. Так, в ходе исследования были изучены различные варианты культуральных сред и отобраны наиболее оптимальные для культивирования кератоцитов и клеток заднего эпителия роговицы. Для характеристики клеточных культур, полученных на разных питательных средах, оценивали как пролиферативную активность клеток, так и сохранность их уникального фенотипа в ходе культивирования. Было установлено, что наиболее оптимальной средой для 2D культивирования кератоцитов является культуральная среда на основе DMEM/F12 с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки и 10 нг/мл фактора роста фибробластов, а для клеток заднего эпителия культуральная среда на основе DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

Автором диссертации изучены и охарактеризованы 3D клеточные сфероиды из кератоцитов, культивируемых в различных комбинациях питательных сред. Показано, что добавление L-аскорбиновой кислоты в питательную среду приводит к максимальному накоплению внеклеточного матрикса, в виде коллагена 1, 3, 5 и 6 типов, и увеличению характерных

морфологических маркеров кератоцитов, таких как кератокан, кератансульфат, люмикан.

Островским Д.С. впервые показана возможность создания 3D клеточных сфероидов из клеток заднего эпителия роговицы с сохранением функциональных и морфологических особенностей полученных клеток.

Другим не менее важным направлением работы является, проведение сравнительного анализ различных полимерных материалов пригодных для создания слоистой структуры роговицы. Наилучшие результаты клеточной адгезии были установлены на следующих материалах: полиметилметакрелат и фиброин шелка. Однако такие ключевые особенности фиброина шелка, как программируемая биodeградируемость материала и сохранения прозрачности в ходе эксперимента обусловили выбор данного материала для создания слоистой структуры роговицы в комбинации с 3D клеточными сфероидами.

Обоснованность использованных методов, а также полученных результатов и положений диссертации

Диссертационная работа Д.С. Островского выполнена с использованием современных методов исследования, включающих культуральные методы, иммуноферментный анализ, проточную цитофлуориметрию и лазерную сканирующую конфокальную микроскопию. Полученные автором фактические результаты подтверждают основные положения диссертации, выносимые на защиту.

В соответствии с поставленными в работе целью и основными задачами автором проведена разработка методов выделения кератоцитов и клеток заднего эпителия роговицы, подобран оптимальный состав питательных сред для культивирования кератоцитов и клеток заднего эпителия, сохраняющий требуемый фенотип клеточных культур, на основе подобранного полимерного материала получена слоистая структура в комбинации с 3D клеточными сфероидами из кератоцитов.

Выбор автором темы работы, ее цели, задач, методов исследования, формулировки основных положений обоснованы результатами анализа данных современной зарубежной и отечественной литературы, достоинств и недостатков

последних достижений клеточных технологий и возможностей их использования для создания искусственной роговицы человека.

Основные положения диссертационной работы, ее результаты и выводы, которые логично завершают исследование, обоснованы и достоверны. Это следует из достаточного количества проведенных экспериментальных исследований. В работе для получения клеточных культур кератоцитов и клеток заднего эпителия было использовано 27 донорских роговиц не пригодных для трансплантации в клинику. Для отработки методики создания 3D клеточных сфероидов, а также для изучения их морфофункциональных особенностей, было создано 5 120 и 1 620 3D сфероидов из кератоцитов и клеток заднего эпителия соответственно. Также, для подбора оптимального полимерного материала было исследовано по 24 фрагмента каждого изучаемого образца.

Д.С. Островским использованы современные методы статистической обработки данных. Сопоставление результатов данного исследования с работами других авторов дает основание считать, что полученные экспериментальные данные являются новыми и достоверными. Необходимо отметить подробный и продуманный дизайн исследования. Большое количество иллюстративного материала, таблиц и расчетных данных позволяет понять логику исследования и подтверждает достоверность полученных выводов.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Выявленные Островским Д.С. в диссертационном исследовании подходы к культивированию кератоцитов и клеток заднего эпителия роговицы обеспечивают сохранение уникальных морфологических и функциональных свойств клеток, что имеет фундаментальное значение для развития новых направлений создания искусственной роговицы.

Дальнейшее развитие начатых исследований ведет к развитию новых эффективных и обоснованных способов создания искусственной роговицы, позволяющих обеспечить потребность в донорском материале и значительно снизить риск развития тканевой несовместимости.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты исследований внедрены в работу Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в постановке задач исследования и разработке концепции, осуществлял сбор материала для исследования, лично выполнял стендовые и экспериментальные исследования. Автором сформирована база данных, проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

Диссертация Островского Д.С. изложена в традиционном классическом стиле на 145 страницах машинописного текста, иллюстрирована 32 рисунками и 5 таблицами. Структура диссертации представлена введением, тремя главами, заключением, выводами и списком цитируемой литературы. Список литературы состоит из 257 источников, в том числе 18 на русском языке и 239 на английском языке.

Обзор литературы представлен в достаточном объеме (38 страниц) и написан, как и вся диссертация, хорошим литературным языком. Стиль изложения позволяет получить образное впечатление о современном состоянии темы настоящего диссертационного исследования.

В главе «Материалы и методы» показана также целесообразность и необходимость использования в настоящей работе других материалов и методов.

В главе «Результаты» данные проведенных исследований в достаточной степени проиллюстрированы рисунками и таблицами. Обращает на себя внимание безупречная логичность и убеждающая обоснованность интерпретации результатов проведенных исследований.

В заключении подводятся итоги проведенных исследований и сопутствующих им научных исследований. При этом дается критическая оценка полученных результатов и дается перспективный анализ дальнейших исследований.

Выводы вполне логично вытекают из результатов диссертационной работы и в достаточной мере соответствуют цели и поставленным задачам проведенного научного исследования.

Диссертация написана без грамматических и стилистических неточностей, изложена хорошим, образным научным языком.

Автореферат оформлен в соответствии с современными требованиями и отражает все необходимые разделы выполненной работы. Автореферат написан хорошим литературным языком, принципиальных замечаний по его содержанию нет.

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 4 статьи в научных журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук и представлены в 6 докладах на российских и международных научных конференциях.

Тексты автореферата и публикаций автора соответствуют тексту диссертации, а тема исследования – специальностям 14.03.03 – Патологическая физиология и 14.01.24 – Трансплантология и искусственные органы.

Таким образом, подводя итог анализу диссертационной работы, необходимо отметить ее целостность и последовательность изложения, современность использованных методов исследования, несомненную научную новизну и практическую ценность.

Замечания

При анализе диссертации Островского Д.С. принципиальных замечаний не возникло.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Островского Дмитрия Сергеевича «Разработка способов конструирования искусственной роговицы на основе 3D клеточных сфероидов и полимерных материалов» является законченным научно-квалификационным трудом, выполненным на высоком научном и методологическом уровне. В работе содержится новое решение актуальной

проблемы регенеративной медицины – 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.

По своей актуальности, научной новизне, объему проведенного исследования, практической значимости и методическому уровню диссертационная работа полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, 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.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании секции по клиническим и биомедицинским технологиям Ученого совета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, протокол заседания № 70 от «18» февраля 2019 года.

Руководитель Центра биомедицинских технологий,
заведующая кафедрой регенеративной медицины,
гематологии, молекулярной цитогенетики
с курсом педиатрии МБУ ИНО
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России,
доцент, доктор медицинских наук

Т.А. Астрелина

123098, Россия, г. Москва, ул. Маршала Новикова, д.23
Телефон; +7 (916) 532 – 56 – 77
Электронная почта: t_astrelina@mail.ru

Подпись доктора медицинских наук Астрелиной Т.А. заверяю

Ученый секретарь
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России,
кандидат медицинских наук



Е.В. Голобородько