

ОТЗЫВ

официального оппонента на
диссертацию Товпеко Дмитрия Викторовича
на тему: «РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПОНЕНТНОГО
СОСТАВА ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ ВАРТОНОВА
СТУДНЯ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ
МЕДИЦИНЫ», представленную на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология

Материалы, изготовленные на основе биологических тканей, давно нашли свое применение в медицине. В частности, к таким материалам относятся медицинские изделия, изготовленные на основе перикардиальной ткани и используемые для изготовления заплат, пластин и сердечных клапанов, а также биологические протезы сосудов, костные импланты/заменители костной ткани и т.д. Вне зависимости от источника (ксеногенный или аллогенный материал) такие материалы требуют специальной обработки для удаления клеток, а с ними и иммуногенных и провоспалительных биомолекул. Этот процесс принято называть децеллюляризацией, а для его выполнения используется несколько подходов, одним из которых является удаление нежелательных компонентов при помощи обработки ткани растворами детергентов. В качестве детергентов используют как ионные так и неионные детергенты, и чаще всего используют такие детергенты как додецилсульфат натрия (SDS), дезоксихолат (ДХ), тритон, твин, Бридж, сахараиды, модифицированные остатком жирной кислоты и т.д. Максимальную солюбилизирующую способность детергенты проявляют в концентрации выше критической концентрации мицеллообразования, которая для неионных детергентов, как правило, много выше, чем для ионных (для SDS и ДХ она составляет 7 и 10 мМ или 0,2% и 0,4% растворы). При этом удаление детергентов является необходимым

этапом процесса децеллюляризации и от его эффективности зависит биосовместимость полученных материалов.

В силу генетических отличий ксеногенные материалы (за исключением таковых из тканей приматов) потенциально более иммуногенны, чем аллогенные, однако источников аллогенных тканей совсем немного. К их числу можно отнести провизорные ткани, либо трупный материал, либо искусственно заселенные человеческими клетками скэффолды (примером может служить протез сосуда от компании Numacyte Inc.). Диссертационная работа Товпеко Д.В. как раз и посвящена работе с провизорной тканью, а именно с получаемым из пуповины человека Вартоновым студнем (ВС) и оценке метода децеллюляризации ВС при помощи растворов додецилсульфата натрия (SDS).

Целью диссертационной работы Товпеко Д. В. была разработка технологии изготовления тканеинженерных продуктов из ВС пуповины человека и исследование их структурных, морфологических и биологических характеристик. В обоснование этой цели автор приводит данные о эффективности использования материалов на основе пуповины человека для регенерации разных тканей, включая хрящевую, костную, сердечную, нервную, а недостаток данных о фундаментальных свойствах материала ограничивает его использование особенно на этапе регистрации медицинских изделий.

Материал диссертационного исследования изложен на 156 страницах, содержит 21 рисунок, 4 таблицы, 7 приложений. Список литературы включает 232 российских и зарубежных источника. Текст диссертации состоит из стандартных разделов: “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты и обсуждение”, “Заключение”, “Выводы”, “Практические рекомендации”, “Список сокращений и условных обозначений”, “Список литературы” и списка приложений.

В разделе «Введение» предпринята попытка описать актуальность работы, ее научную новизну и практическую значимость. В доказательство актуальности автор приводит информацию о необходимости улучшения эффективности лечения раневых повреждений и востребованности материалов, имеющих высокий регенеративный потенциал, отмечая необходимость соответствия структуры такого материала замещаемой ткани. С этой точки зрения провизорные ткани могут рассматриваться в качестве заменителей малодифференцированного внеклеточного матрикса (ВМ). Автор утверждает, что ВС представляет собой твердую слизистую соединительную ткань внеэмбрионального происхождения (это эмбриональная слизистая (студенистая) соединительная ткань). Автор не позиционирует свою разработку, как ткань для лечения ран, по-видимому, поскольку на тему децеллюляризации ВС и использования его для лечения ран уже была защищена диссертационная работа.

Задачи исследования в целом соответствуют положениям, выносимым на защиту.

Научная новизна исследования заключается в использовании автором не 0,05 %, а 0,01 % раствора SDS для децеллюляризации ткани и исследовании полученного материала на предмет анализа остаточных количеств SDS и белков методом как масс-спектрологии, а также исследованию структуры и состава ВС, равно как и биологических свойств децеллюляризованного ВС (дВС) в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

В разделе «Обзор литературы» автор обсуждает использование тканевых лоскутов для лечения ран, и использование для этих целей скэффолдов и требований к ним, однако упускает вопросы, связанные с объемом раны и применимостью тканеинженерных подходов в зависимости от объема раневого повреждения. При этом разбирается строение ВМ, его белковый и полисахаридный состав, а также функции отдельных биополимеров из состава ВМ. В этом же разделе описаны методы децеллюляризации тканей,

включая физические, химические, ферментативные методы. В разделе встречаются спорные утверждения о влиянии pH, нет обоснования выбора детергента и условий децеллюляризации. Поскольку автор использует обработку ВС замораживанием/оттаиванием, гипотоническими растворами SDS, то автору следовало бы более детально остановиться на этих процессах. Было бы уместно описать связывание SDS с белками, его цитотоксические концентрации, физические основы сольюбилизации биомолекул SDS-ом и влиянию взаимодействий молекул SDS друг с другом и с биомолекулами на эффективность его удаления из ВС (критическая концентрация мицеллообразования), важность соотношения веса SDS и ткани, объемов децеллюляризирующей и отмывочной жидкостей, влиянию замораживания/оттаивания (циклов и режимов), гипотонических обработок, в том числе и с учетом зависимости растворимости биомолекул в водных растворах от ионной силы и pH. В главе оценки качества децеллюляризации автору следовало бы уделить больше внимания оценке таких компонентов ВМ, которые принципиальны для повышения эффективности использования дВС для замены/мимикрирования ВМ. К числу таких факторов относятся факторы миграции и пролиферации клеток, биodeградация и замена новой тканью, использование и применимость методов анализа интересующих биомолекул (факторов роста, LPS, остаток веса) их чувствительность и специфичность и т.д. Это позволило бы автору более критично оценивать данные литературных источников и результаты собственных экспериментов.

П 1.3. можно было бы смело удалить, поскольку он не имеет прямого отношения к теме (примеры использования тканезамещающих материалов), а информации, представленной в п. 1.4. вполне достаточно для демонстрации важности разработки методов получения дВС.

Раздел «Материалы и Методы» в целом описывает методы, используемые в работе. Автор описывает входной контроль материала, однако в число тестируемых показателей стоило бы включить больше инфекционных агентов, например, вирусы гриппа, парагриппа, коронавирус SARS-CoV-2,

папилломавирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус герпеса (саркома Капоши), и т.д. и, возможно, бактериальные инфекции.

При этом приготовление дВС и его пепсинового лизата описано очень поверхностно. Из текста непонятно как фрагментировали пуповину (размер фрагментов), соотношения объемов (веса) ВС и растворов, количество отмывок и т.д., что не позволяет воспроизвести процесс и оценить взаимодействия компонентов. Этой информации нет и в Приложении А. Известно, что критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) SDS варьирует по данным разных авторов от 0,8 до 8 мМ (0,24%, сольюбилизирующая способность детергентов растет выше этой концентрации), при концентрации 0,14 % SDS диссоциирует субъединичные белки, соотношение SDS : белок варьирует в диапазоне 0,7-1:1 (вес/вес), Кд SDS-белковых комплексов $\sim 1.4 \times 10^{-3}$ М. Т.е. соотношение объема раствора SDS и веса пуповины принципиально для понимания вклада SDS и гипотонической обработки ткани в процесс децеллюляризации. В работе не приведены условия лиофильной сушки, а, в частности концентрация раствора перед лиофилизацией принципиально определяет его структуру таблетки.

Недостаток в техническом описании процедур применим к разным разделам «Материалов и Методов» в частности, к определению концентраций ДНК (как элюировали, в каком объеме измеряли, сколько наносили на электрофорез).

Непонятно, как оценивали цитотоксичность и как выполняли требования ГОСТ 10993-12 по соотношению экстрагент : изделие.

При описании исследования *in vivo* отмечено, что имплантировали 10 мг дВС. При условии, что ранее авторы упоминали о быстрой биодegradации ткани (в статьях авторов в течение 3-4 недель) не означено, как авторы отмечали места имплантации дВС и как им удавалось точно эксплантировать именно участок ткани с дВС, особенно на поздних сроках инкубации.

Серьезным недостатком экспериментального дизайна является отсутствие контролей с концентрацией SDS выше ККМ, и контролей при использовании методов (например, не отмытых тканей при измерении остаточной концентрации SDS).

В разделе «Результаты и обсуждение» представлены характеристики полученного дВС и пепсинового гидролизата дВС. Представлены данные гистологического исследования, остаточных концентрациях ДНК и SDS, концентрациях коллагенов и полисахаридов, белковом составе дВС, биосовместимости дВС оцененной в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

На гистологических препаратах видно, что процесс децеллюляризации приводит к существенному изменению структуры ткани и, по видимому, потере структурных компонентов ВС. В этой связи очень нелишними были бы данные о потере веса при децеллюляризации. Для характеристики дВС не были бы лишними привести такие общие физико-химические характеристики, как плотность, удельный вес, насыпная плотность, прочность, способность поддерживать форму, водопоглощение, и т.д. Поскольку авторы планируют использование дВС в качестве медицинского изделия, то наличие данных, которые могли бы быть использованы в качестве входных контролей для характеристики успешности процесса децеллюляризации, воспроизводимости процесса были бы крайне желательны.

Отсутствие данных относительно потери веса затрудняет анализ данных гистологического исследования. Структуры ткани до и после децеллюляризации отличаются принципиально, очевидно, что процесс децеллюляризации приводит к потере основной части структурных элементов ткани. Данные окрашивания по трихромом Массона представлены неудачно – все образцы (в том числе исходная плацента) окрашены в синий цвет (как коллагеновые волокна), нет цветной окраски иных структур, в том числе и в исходной плаценте (клеток, ядер и т.д.).

Для анализа белкового многообразия авторы использовали MALDI-TOF спектроскопию. Приведены данные, описывающие протеом дВС, и выполнен их анализ. Представленные данные были бы более достоверными, если бы автор привел «score» для идентифицированных белков. Сравнение с исходной плацентой было бы очень полезно, равно как и, возможно, исследование концентраций таких факторов как TGF, VEGF, FGF, про которые автор упоминает в контексте их важности для эффективного взаимодействия дВС с клетками реципиента.

Данные ИК-Фурье спектроскопии выглядят избыточными, равно как и данные по гемосовместимости (гемолиз). С одной стороны автор не позиционирует конкретного применения дВС, а с другой маловероятно, что этот материал может быть использован для изготовления изделий, длительно контактирующих с кровью (см ГОСТ 10993-4), да и тестирование гемосовместимости подразумевает выполнение тестов, таких как тесты на адгезию и агрегацию тромбоцитов, влияния материала на коагуляцию (ЧТВ, Д-Димер, и т.д), гематологические характеристики крови (ОАК, лизис эритроцитов, активация клеток (высвобождение факторов, эластаза ПМЛ)), и индукция иммунологических реакций (компоненты комплемента, активация лейкоцитов)) после контакта с исследуемым материалом. Кроме того, очень важно соотношение поверхности материала к объему крови. Оно гостировано и его следует указывать.

Тестирование образцов дВС *in vitro* не вызывает сомнений, в то время как описание тестирования *in vivo* занимает 14 строчек, а иллюстративный материал крайне сложен для восприятия, поскольку на изображениях не выделены стрелками принципиальные места, нет предметного описания гистологического исследования, а представлено только общее заключение.

В главе «Выводы», представлено 4 вывода, они в целом соответствуют задачам (4 задачи) и положениям, выносимым на защиту (3 положения). В целом выводы, сделанные по результатам работы, соответствуют

полученным данным и данные, на основании которых сделаны выводы, опубликованы.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с общепринятыми требованиями, в целом отражает содержание работы, хотя описание результатов чрезмерно лаконичное и иллюстрировано только 3 рисунками.

Кроме вышеупомянутых замечаний при прочтении диссертации возникло несколько замечаний/вопросов:

1. В положениях, выносимых на защиту (пункт 2) отмечено, что «разработана технология изготовления тканеинженерных продуктов из Ватронова студня». Разработка технологии изготовления подразумевает разработку по меньшей мере Технологического регламента (хотя бы временного) и Технических условий на продукт, Паспорта изделия, и т.д.. Приведенный в приложениях «Лабораторный регламент...» не является таковым документом. Лабораторный регламент как таковой подразумевает описание оборудования, расходных материалов и реагентов, приготовления растворов и описание процедуры. Есть ли у автора диссертации эти документы? Почему то, что представлено в приложениях не описано в тексте как отдельный пункт?

2. В выводе 1 отмечено, что децеллюляризация ВС с использованием 0,01% SDS «обеспечивает достижение рекомендуемого уровня антигенности и иммуногенности». Есть ли данные о этих характеристиках полученного дВС?

3. В выводе 2 отмечено, что дВС содержит «функциональные молекулы фибронектина, люмикана, бигликана и т.д». Может ли автор представить прямые доказательства их «функциональности»?

4. В выводе 3 сказано, что продукты из ВС «сохраняют потенциально целостность тройной спирали молекул коллагенов». Что автор имел ввиду формулируя эту фразу?

5. Для приготовления лизата дВС используется пепсин. Как вы оцениваете его иммуногенность (и влияние контаминантов) в составе вашего продукта?

6. Почему вы не исследуете пирогенность материалов или их контаминацию бактериальным липополисахаридом? Или у вас есть данные на сей счет?

Диссертационная работа Д.В. Товпеко в целом соответствует паспорту специальности 1.5.6 – Биотехнология. Диссертация «Разработка и исследование компонентного состава тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека для регенеративной медицины», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является научно-квалификационной работой, обладающей некоторой научной новизной и теоретической значимостью, имеет перспективы практического использования полученных результатов. Тема работы актуальна для развития методов децеллюляризации и последующего практического использования материалов на основе ВС, достоверность тех результатов, которые можно оценить исходя из описанных методов не вызывает сомнений, научная новизна в большей мере связана с более детальным описанием дВС (ранее уже были опубликованы и защищены Кондратенко А.А. аналогичные результаты децеллюляризации ВС с использованием 0,05% SDS). Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендации в целом может быть оценена как удовлетворительная.

Работа в целом соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 N 842 (ред. от 01.10.2018, с изм. от 26.05.2020) "О порядке присуждения ученых степеней" (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 г. N 723; от 21.04.2016 г. N 335; от 02.08.2016 г. N 748; от 29.05.2017 г. N 650; от 28.08.2017 г. N 1024; от 01.10.2018 г. N 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой

степени кандидата наук, а ее автор – Товпеко Дмитрий Викторович – может претендовать на присуждение ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Главный научный сотрудник,
заведующий лабораторией
молекулярной медицины
ИХБФМ СО РАН,
кандидат биологических наук



Лактионов Павел Петрович

Подпись Лактионова П.П. заверяю:
Ученый секретарь ФГБУН ИХБФМ СО РАН,
кандидат биологических наук



Е. Б. Логашенко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук
630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8
тел. (383) 363-51-43 lakt@niboch.nsc.ru.