

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата биологических наук, заместителя директора по науке Научно-исследовательского института экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России Ширмановой Марины Вадимовны на диссертационную работу Антошина Артема Анатольевича «Биодеградируемые матрицы на основе фибриллярного коллагена для аугментационной уретропластики», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

### Актуальность избранной темы

Стриктура уретры – довольно распространенное урологическое заболевание, лечение которого, чаще всего, хирургическое. «Золотым стандартом» в лечении стриктур уретры является применение аутологичного графта слизистой щеки пациента, однако данный подход имеет ряд ограничений, таких как небольшой доступный размер графта, высокая вероятность инфекционных осложнений, а также болезненность в зоне забора графта. В качестве альтернативы для целей уретропластики предлагаются искусственные импланты на основе коллагена (коллагеновые матрицы).

Наиболее распространенными являются коллагеновые матрицы, полученные из децеллюляризованной подслизистой основы тонкой кишки, слизистой мочевого пузыря, дермы кожи. Несмотря на то, что такие коллагеновые матрицы уже применялись в операциях по уретропластике, успешность этих операций варьировалась в широком диапазоне - от 20 до 100%. Это связано с высокой природной изменчивостью исходных коллагенсодержащих тканей и их

слабой стандартизуемостью, в то время как наличие остаточных антигенов в структуре децеллюляризованных тканей может дополнительно способствовать развитию про-фибротического иммунного ответа и повторному стриктурированию просвета уретры.

Перспективной заменой коллагеновым матрицам, полученным из децеллюляризованных тканей, являются матрицы, полученные при помощи различных методов реконструкции, поскольку их свойства более стабильны и стандартизованы, а содержание остаточных антигенов – минимально. Особый интерес, особенно в сложных случаях уретропластики, представляют коллагеновые матрицы, заселенные собственными клетками пациента. В связи с этим, диссертация Антошина А.А., нацеленная на создание тканеинженерного конструктора уретры на основе механически прочных коллагеновых матриц, является актуальной и значимой с точки зрения биоинженерии.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Сформулированные в диссертации Антошина А.А. научные положения и выводы основаны на результатах собственных экспериментальных исследований автора. Их обоснованность и корректность обуславливается грамотно проработанным дизайном исследования, достаточным объемом экспериментального материала, применением адекватных методов статистического анализа, а также общей логикой построения диссертационной работы.

Работа выполнена на высоком методическом уровне. В исследовании разработан оригинальный способ создания коллагеновых матриц при помощи электрофоретического осаждения с полупроницаемым барьером (ЭФО-ППБ), метод заселения коллагеновых матриц клеточными сфероидами при помощи лазерно-индуцированного прямого переноса (LIFT), применены современные методы для изучения структуры полученных коллагеновых матриц (атомно-

силовая, сканирующая электронная, фазово-контрастная, поляризационная микроскопии), их физико-химических свойств (механические испытания, гель-электрофорез, измерение остаточной ДНК), биосовместимости *in vitro* (тесты Alamar Blue®, Picogreen®, Живой/Мертвый, конфокальная микроскопия) и *in vivo* (подкожная имплантация крысам, имплантация в уретру кроликам, гистологический и иммуногистохимический анализ).

Для проведения испытаний *in vitro* в каждой группе брали не менее 5 образцов, в случае испытаний *in vivo*, количество животных на точку было не менее 5 (подкожная имплантация) или 3 (аугментационная уретропластика), что является достаточным для надежного охарактеризования исследуемых тканеинженерных конструктов и интерпретации результатов.

Все вышеперечисленное доказывает, что сформулированные на основании полученных результатов научные положения, выводы и рекомендации диссертационной работы А.А. Антошина являются обоснованными.

### **Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Основные положения, выводы и практические рекомендации полностью отражают результаты проведенных исследований, а также логически следуют из поставленной цели и задач диссертационной работы. Достоверность полученных результатов обеспечивается широкой методологической базой исследования, работой на сертифицированном высокотехнологическом оборудовании, применением высококачественных реагентов и прочих расходных материалов, использованием адекватных методов статистической обработки результатов.

Проведенное А.А. Антошиным исследование отличается высокой степенью новизны. В работе впервые разработана технология электрофоретического осаждения коллагеновых матриц при помощи полупроницаемого барьера. Показано, как могут изменяться механические свойства коллагеновых матриц в зависимости от количества циклов электрофоретического осаждения, установлена

их более высокая растяжимость в сравнении с матрицами, полученными сушкой на воздухе.

Впервые полученные методом электрофоретического осаждения коллагеновые матрицы были испытаны в качестве импланта на модели аугментационной уретропластики у кроликов. Показана их эффективность в предотвращении развития стриктурирования уретры на сроке наблюдения до 180 дней, в то время как в контрольной группе уже на 45 день наблюдения у 67% (2 из 3) животных клинически и морфологически развивалась стриктура уретры, и эксперимент был остановлен.

Впервые автором была продемонстрирована возможность биопечати клеточных сфероидов методом лазерно-индуцированного прямого переноса, что стало возможным за счет использования оптического устройства – Пи-шейпера. Пи-шейпер позволил минимизировать негативное влияние лазерного излучения на клеточный компонент, тем самым повысив выживаемость клеток после биопечати до 95%.

### **Значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Полученные в работе результаты несут фундаментальное и прикладное значение. Научная значимость полученных результатов диссертационного исследования состоит в разработке комплексного подхода к созданию тканеинженерного конструкта уретры при помощи электрофоретического осаждения с полупроницаемым барьером (получена прочная коллагеновая матрица на основе фибриллярного коллагена), а также метода лазерно-индуцированного прямого переноса (коллагеновая матрица заселена клеточным компонентом) как альтернативы традиционно используемому трансплантату слизистой щеки. Разработанный подход может быть использован не только для целей уретропластики, но и также при создании искусственных аналогов других анатомических структур, например, кожи, роговицы, хряща и связок. В том числе, данные анатомические структуры могут быть созданы «на чипе» (organ-on-a-chip)

в качестве биологических моделей, что открывает широкие возможности для проведения фундаментальных биологических исследований *in vitro*.

Значимость научных результатов диссертационного исследования подтверждается их принятием ко внедрению в производство российским индустриальным производителем коллагеновых биоматериалов ЗАО «Зеленая дубрава». Кроме того, за разработку технологии лазерно-индуцированного прямого переноса А.А. Антошин стал лауреатом премии Правительства Москвы молодым ученым за 2021 год в области разработок для биотехнологий. Все это подтверждает высокую практическую значимость полученных в диссертационной работе результатов.

### **Соответствие диссертации паспорту специальности**

Диссертационное исследование А.А. Антошина полностью соответствует паспорту научной специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия, а именно областям исследований: «Создание заменителей органов и тканей» (п. 10), «Выращивание методами регенеративной медицины органов и тканей для компенсации утраченных или компенсации их пониженных физиологических функций» (п. 18).

### **Полнота освещения результатов диссертации в печати**

Материалы диссертационной работы в полной мере отражены в 10 научных публикациях, из которых 6 статей опубликовано в журналах, индексируемых в международной базе данных Scopus, 1 иная публикация по теме диссертационного исследования, 3 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

## Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа А.А. Антошина изложена на 167 страницах, состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка использованной литературы, включающего 260 источников (257 иностранных, 3 отечественных). В диссертационной работе содержится 45 рисунков и 6 таблиц.

Во Введении автором довольно полно и понятно представлена актуальность проводимого исследования, четко определена цель и сформулированы задачи исследования, показана научная и практическая значимость работы, вынесены положения на защиту.

В первой главе «Обзор литературы» проведен анализ литературы, посвященной созданию тканеинженерных матриц для целей уретропластики, рассмотрены небiodeградирующие и биодеградирующие матрицы, дана характеристика метода электрофоретического осаждения, проанализированы исследования по биопечати в урологии.

Во второй главе «Материалы и методы» подробно описаны общий дизайн диссертационного исследования, принцип и механизм электрофоретического осаждения коллагена с полупроницаемым барьером, устройство установки для лазерно-индуцированного прямого переноса. Детально описана методология проведения структурных и физико-химических испытаний коллагеновых матриц, тестирования их биосовместимости на клеточных линиях *in vitro*. Описан экспериментальный дизайн исследований на модели подкожной имплантации у крыс, на модели аугментационной уретропластики у кроликов, приведены протоколы гистологического, иммуногистохимического и морфометрического исследований. Все разделы главы хорошо проиллюстрированы.

В третьей главе «Результаты исследований» охарактеризованы структурные и физико-химические свойства получаемых методом ЭФО-ППБ коллагеновых матриц, показан различный биологический ответ на модели подкожной имплантации матриц у крыс в зависимости от химической сшивки матрицы, на



основе ЭФО-ППБ коллагеновых матриц получены матрицы с ассиметричной (Янус) структурой и охарактеризованы их структурные и механические свойства, доказана эффективность Янус-матриц в качестве трансплантатов на модели аугментационной уретропластики у кроликов, создан модельный тканеинженерный конструкт уретры с помощью метода LIFT.

В четвертой главе «Обсуждение» дана критическая оценка полученных автором результатов, результаты сопоставлены с данными, представленными в мировой литературе. Обсуждены ограничения текущего исследования и возможности для дальнейшей научной работы.

В разделе «Заключение» подведен итог выполненной работы. Выводы и практические рекомендации логически вытекают из основных результатов исследования и полностью соответствуют поставленным целям и задачам.

### **Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации**

Текст автореферата полностью отражает основное содержание диссертации, ее положения, выводы и практические рекомендации.

### **Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации**

Текст диссертации написан логично и последовательно, соблюдены все необходимые требования по структуре и содержанию. Диссертация аккуратно оформлена и написана грамотным языком. Замечаний по оформлению и содержанию работы нет. Тем не менее, в процессе защиты хотелось бы услышать ответы на следующие вопросы:

- В работе упоминается важность процессов неоангиогенеза на месте имплантации матрицы при уретропластике, однако при анализе результатов автор не приводит какой-либо статистической оценки и сравнения этого параметра

между экспериментальной и контрольной группами. Была ли между ними разница?

- Из описания методики LIFT-биопечати (пп. 1.7, 2.6.1) не понятен базовый принцип переноса сфероидов с помощью лазерного излучения. Каков механизм «захвата» и «высвобождения» сфероида в нужной локализации на подложке? Также прошу пояснить, какие факторы могут оказывать влияние на качество переноса клеточных сфероидов?

- Для получения модельного тканеинженерного конструкта в работе использованы МСК, а не специфичные для уретры клетки. Вопрос – какие из специфичных клеток потенциально могут быть использованы для задач уретропластики? Возможно ли их культивирование и формирование из них сфероидов?

Поставленные вопросы носят уточняющий характер, не снижают научной ценности работы и не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования Антошина Артема Анатольевича.

### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Антошина Артема Анатольевича «Биодеградируемые матрицы на основе фибриллярного коллагена для аугментационной уретропластики» является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной задачи в области биоинженерии – разработки тканеинженерной матрицы на основе коллагена, обладающей высокой эффективностью в качестве трансплантата при проведении операций по уретропластике.

По своей актуальности, научной новизне, практической значимости и полученным результатам диссертационная работа соответствует требованиям п. 16 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова



Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом ректора от 06.06.2022 г. № 0692/Р, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Антошин Артем Анатольевич достоин присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия.

**Официальный оппонент:**

кандидат биологических наук,  
ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России,  
НИИ экспериментальной онкологии  
и биомедицинских технологий,  
заместитель директора по науке

12.12.2023  Ширманова М. В.

Подпись кандидата биологических наук Ширмановой Марины Вадимовны  
«заверяю»

Ученый секретарь университета  
доктор биологических наук



 Андреева Н.Н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России

Адрес: 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского. д.10/1

Телефон: +7 (831) 422-20-00

E-mail: rector@pimunn.net