

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Кудан Елизаветы Валерьевны на диссертационную работу Бикмулиной Полины Юрьевны на тему «Фабрикация гидрогелевых тканеинженерных конструкций на основе мезенхимных стромальных клеток с использованием методов 3D биопечати и фотобиомодуляции в красном и ближнем инфракрасном диапазоне», представленную в диссертационный совет ДСУ 208.003.03 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия, 1.5.22. Клеточная биология.

Актуальность темы исследования

В настоящее время регенеративная медицина и тканевая инженерия являются одними из наиболее приоритетных и динамично развивающихся направлений биомедицины. Проблема создания функциональных и клинически применимых тканеинженерных конструкций сохраняет свою высокую актуальность на протяжении последних двух десятилетий. В условиях старения населения и роста потребности в восстановлении утраченных органов и тканей вследствие травм, заболеваний и врожденных дефектов, существующие традиционные методы замещения демонстрируют существенные ограничения, такие как нехватка донорского материала и риски отторжения. По прогнозам аналитиков, к 2030 году мировой рынок биопечати может достигнуть стоимости в несколько миллиардов долларов, что свидетельствует о колоссальном практическом потенциале этой технологии.

Ключевым технологическим барьером на пути к клиническому внедрению тканеинженерных конструкций остается низкая выживаемость и быстрое снижение биологической активности клеток после процесса печати. По оценкам многочисленных исследований, экструзионная биопечать, являющаяся наиболее распространенным методом, подвергает клетки значительным сдвиговым нагрузкам и стрессу, что приводит к массовой гибели до 30-40% клеточной популяции в первые сутки после печати. Эта проблема является критической, поскольку напрямую определяет эффективность и безопасность будущей терапии.

Долгое время усилия исследователей были сосредоточены преимущественно на оптимизации биочернил и параметров печати. Однако в последнее время все большее внимание уделяется методам постобработки и биофизической стимуляции напечатанных конструкций для поддержания жизнеспособности клеток и ускорения их функционального созревания. Известны работы, демонстрирующие потенциал фотобиомодуляции *in vitro* для улучшения пролиферации и паракринной секреции мезенхимных стромальных клеток (МСК). Несмотря на это, комплексные исследования, направленные на комбинацию методов 3D-биопечати и ФБМ для создания тканеинженерных конструкций на основе МСК в гидрогелевых носителях, до настоящего момента не проводились.

В связи с этим выполненное диссертационное исследование, цель которого заключается в разработке и экспериментальном обосновании метода фабрикации гидрогелевых тканеинженерных конструкций на основе МСК с применением 3D-биопечати и последующей фотобиомодуляции в красном и ближнем инфракрасном диапазоне для повышения их жизнеспособности и функциональной активности, является чрезвычайно актуальным, современным и имеет важное научно-практическое значение.

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

Диссертационная работа имеет высокую степень методологической проработанности. Экспериментальные исследования базируются на современных подходах клеточной биологии и биоинженерии. Применение комплексной методики оценки клеточной жизнеспособности и пролиферации, включающей морфометрический и метаболический анализ, обеспечивает достоверность полученных результатов.

Достоверность полученных результатов и новизна исследования

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационном исследовании, определяется комплексным подходом, применением современных экспериментальных методов и корректной статистической обработкой данных. Автором был проанализирован значительный массив современных отечественных и зарубежных литературных источников (более 300 ссылок), посвященных клеточной биологии МСК, биофабрикации, разработке гидрогелевых носителей и механизмам фотобиомодуляции. Этот анализ послужил надежной основой для формулировки гипотезы, постановки цели и конкретных задач исследования. Для решения поставленных задач был применен широкий спектр современных и взаимодополняющих методов: выделение и характеристика МСК, оценка жизнеспособности, реологическая характеристика гидрогелей, экструзионная 3D-биопечать с оптимизацией ее параметров, применение строго контролируемых параметров облучения (длина волны, интенсивность, время экспозиции), иммуноцитохимия и конфокальная микроскопия. Полученные количественные данные были обработаны с использованием современных статистических методов с применением соответствующего программного обеспечения. Во всех случаях указывается значение критерия статистической значимости (p -value), что подтверждает надежность выводов. Все положения, выносимые на защиту, находят свое подтверждение в представленных результатах и их интерпретации. Логичность изложения и последовательность аргументации не вызывают сомнений.

Таким образом, комплексный характер исследования, адекватно поставленные задачи и дизайн экспериментов, применение современных высокочувствительных методов и корректная статистическая обработка результатов позволяют сделать вывод о высокой степени достоверности полученных данных и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Полученные данные вносят вклад в фундаментальные знания о поведении сфероидов из МСК в трехмерных условиях при биопечати и о возможностях управления их восстановлением с помощью физических факторов. Разработанная модель является ценным инструментом для дальнейших исследований в области тканевой инженерии.

Для практики значение работы потенциально высоко, но требует дальнейших исследований. Предложенный подход может лечь в основу новых протоколов создания более эффективных тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины, особенно в области травматологии, ортопедии и дерматологии. Перед клиническим применением необходимо дополнительное проведение исследований *in vivo* на животных моделях для оценки не только эффективности, но и безопасности комбинированного воздействия. На данном этапе практическая значимость работы подтверждается зарегистрированными патентами на изобретение и внедрением результатов диссертации в учебную деятельность Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Соответствие диссертации паспорту специальности

Диссертация Бикмулиной П.Ю. соответствует паспортам научных специальностей 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия, а именно пунктам 10, 11, 18, и 1.5.22. Клеточная биология, а именно пунктам 11; 12; 14; 18.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

Результаты диссертационного исследования Бикмулиной Полины Юрьевны освещены в 25 печатных работах, включающих 7 оригинальных научных статей в изданиях, индексируемых в международных базах, 3 иные публикации, 3 патента, а также 12 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Характеристика структуры и содержания диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, шести глав с результатами, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. В работе использованы 5 отечественных и 331 зарубежный источник литературы. Содержание диссертации отражает заявленные цели и задачи. Иллюстративный материал (54 рисунка и 8 таблиц) наглядно демонстрирует полученные результаты.

Введение содержит обоснование актуальности проводимого исследования, определены его цель и конкретные задачи. В данном разделе также раскрываются элементы научной новизны и практической ценности работы, дается описание примененных методологических принципов. Автором четко сформулированы основные

защищаемые положения, приведены доказательства апробации и достоверности результатов. В разделе указаны объем и структурные особенности диссертации.

В первой главе «Обзор литературы» проведен анализ современных научных достижений в сфере тканевой инженерии и биофабрикации, биологии мезенхимных стромальных клеток (МСК) и фотобиомодуляции (ФБМ). Систематизированы сведения о современной классификации и происхождении МСК, особенностях применения клеточных сфероидов в биофабрикации. Обобщены фундаментальные аспекты фотобиомодуляции (ФБМ), включая клеточные механизмы, оптические параметры и возможности использования в тканевой инженерии.

Во второй главе «Материалы и методы» подробно охарактеризованы экспериментальные подходы, использованные в работе. Исследование включает несколько компонентов и стадий и построено на применении современных методов биоинженерии и клеточной биологии: двумерного и трехмерного (в условиях гидрогеля, в виде клеточных сфероидов, в тканеинженерных конструкциях, полученных методом 3D биопечати) культивирования клеток, проточной цитофлуориметрии, экструзионной биопечати, реометрии, спектроскопических и морфометрических способов анализа морфологии и жизнеспособности клеток. Достоверность результатов подтверждена использованием актуальных статистических методов.

В главах, посвященных экспериментальным исследованиям (главы 3.1 – 3.6), автор последовательно излагает полученные результаты, подкрепленные фактическими данными, направленными на решение отдельных задач в соответствии с целью работы.

В главе 3.1 описан процесс культивирования и характеристики мезенхимных стромальных клеток, протокол получения клеточных сфероидов и некоторые другие аспекты, касающиеся морфологии МСК.

Глава 3.2 содержит результаты разработки состава гидрогеля для 3D-биопечати, включая сравнительный анализ двух вариантов гидрогелей по их физико-химическим и биологическим свойствам, а также процедуру подбора условий полимеризации.

В главе 3.3 представлены результаты по подбору состава биочернил и набора параметров 3D биопечати, а также содержится информация о технических особенностях данного процесса при использовании гидрогеля на основе желатина и фибрина и клеточных сфероидов.

В главе 3.4 отражены результаты по созданию и характеристике тканеинженерных конструкций на основе сфероидов из МСК, включая сравнение жизнеспособности качественными и количественными методами, спраутинга сфероидов, дифференцировки клеток в различных условиях трехмерных культур на сроках от 3 до 21 дня культивирования.

Глава 3.5 содержит данные по выбору режимов фотобиомодуляции и идентификации основных клеточных мишеней, а также результаты исследований токсичности ингибиторов митохондриальных комплексов и метаболического ответа МСК на ФБМ в условиях ингибирования.

Глава 3.6 демонстрирует результаты комбинации разработанных на предыдущих этапах подходов к трехмерной биопечати и ФБМ клеточных сфероидов из МСК и сравнение результатов с использованием разработанного ранее комплекса методов.

В четвертой главе представлено развернутое обсуждение полученных результатов, сформулированы выводы по каждой из экспериментальных глав.

Диссертационная работа завершается заключением, в котором раскрывается значимость полученных результатов. На их основе автором сформулировано семь выводов, полностью соответствующих цели и задачам исследования.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями, отражает основное содержание диссертации и раскрывает основные положения, выносимые на защиту.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Принципиальные замечания к представленной диссертационной работе отсутствуют. В дискуссии прошу автора ответить на следующие вопросы:

1. Положение 2: «Использование метода 3D биопечати позволяет повысить функциональность тканеинженерных конструкций на основе сфероидов МСК». Что автор имеет в виду под термином «функциональность»?
2. Стр. 80 «Были разработаны критерии определения оптимальной печатаемости ...». В мировой литературе по биопечати уже разработаны и предложены различные способы оценки печатаемости гидрогелей. Чем предложенные в диссертационной работе критерии лучше имеющихся в литературе?
3. В представленных тканеинженерных конструктах плотность сфероидов очень низкая. При таком подходе, какие преимущества использования сфероидов перед использованием клеток? Проводили ли сравнение конструктов, полученных путем биопечати гидрогеля с клетками и биопечати гидрогеля со сфероидами? Если нет, то какие показатели (например, плотность клеток, их жизнеспособность, способность к дифференцировке и т.п.) могли бы быть использованы в качестве параметров сравнения?
4. Согласно представленным данным при биопечати наблюдается улучшение некоторых показателей функционирования клеток по сравнению с замешиванием сфероидов в гидрогель вручную. С чем, по мнению автора работы, это может быть связано?
5. Чем предложенный метод неинвазивной стимуляции фотобиомодуляцией принципиально предпочтительнее других стратегий повышения жизнеспособности клеток после печати, например, включения в гидрогель биоактивных факторов (например, VEGF, bFGF)?

6. Возможно ли влияние комбинированного воздействия (биопечать + ФБМ) на более сложные процессы, такие как направленная дифференцировка МСК или формирование сосудистой сети в напечатанных конструкциях?
7. С какими основными технологическими сложностями может столкнуться масштабирование данного подхода? В частности, как будет решаться проблема светорассеяния и равномерности облучения объемных конструкций?

Также есть несколько замечаний к работе:

1. В представленном варианте диссертации Таблица 4 не заполнена, в ней отсутствуют данные.
2. На рисунках 11, 38 и 39 нет подписи, чему соответствует размерная шкала.
3. Работа бы очень выиграла, если бы в ней были представлены фотографии конструкторов целиком, позволяющие оценить плотность сфероидов и равномерность их распределения внутри конструкторов.
4. Положение 4. «Использование фотобиомодуляции при создании 3D тканеинженерных конструкций позволяет повысить их выживаемость». Мне кажется, для данного вывода недостаточно данных. При текущей формулировке это означает, что фотобиомодуляция повышает жизнеспособность клеток при создании любых 3D тканеинженерных конструкций с использованием любых типов клеток и гидрогелей.

Приведенные замечания носят частный характер и не влияют на суть сформулированных выводов и положений, выносимых на защиту, а также на общую положительную оценку диссертационного исследования.

Заключение

Диссертационная работа Бикмулиной Полины Юрьевны на тему: «Фабрикация гидрогелевых тканеинженерных конструкций на основе мезенхимных стромальных клеток с использованием методов 3D биопечати и фотобиомодуляции в красном и ближнем инфракрасном диапазоне» на соискание ученой степени кандидата биологических наук является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи по разработке способа получения тканеинженерных конструкций методом 3D биопечати с высокой жизнеспособностью клеточных сфероидов, имеющей существенное значение для теории и практики биоинженерии и клеточной биологии, что 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 № 0692/Р от 06.06.2022 года (с изменениями,

утвержденными: приказом №1179/Р от 29.08.2023г., приказом №0787/Р от 24.05.2024г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Бикмулина Полина Юрьевна заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальностям 1.1.10. Биомеханика и бионженерия, 1.5.22. Клеточная биология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук (03.03.04. Клеточная биология, цитология, гистология),
заведующий научно-образовательной лабораторией
тканевой инженерии и регенеративной медицины
Федерального государственного автономного образовательного учреждения
высшего образования
«Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС»

 - Кудан Елизавета Валерьевна

Подпись Кудан Елизаветы Валерьевны заверяю

Проректор по безопасности и общим вопросам ФГАОУ ВО «Национальный
исследовательский технологический университет «МИСИС»
к.т.н.



 И.М. Исаев

01 09 2025г.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС»
Адрес: 119049, Москва, Ленинский пр-кт, д. 4, стр. 1.
Телефон: +7 (495) 237-22-22
Электронная почта: personal@misis.ru
Адрес в сети интернет: www.misis.ru