

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Балашова Виктор Андреевича
“Разработка биомиметических моделей сердечной ткани *in vitro*”,
представленную на соискание учёной степени кандидата биологических
наук по специальности 03.01.02 - Биофизика

Актуальность

Тема диссертационной работы Балашова В.А. посвящена развитию актуального направления современной медицинской биотехнологии - тканевой инженерии сердца. Одной из важнейших задач этой области науки является разработка имплантатов для исправления повреждений и регенерации сердечной ткани.

Это направление тканевой инженерии является чрезвычайно актуальным, так как в его рамках разрабатываются перспективные методы терапии последствий инфаркта миокарда - опасного состояния, затрагивающего миллионы людей по всему миру и являющегося одной из лидирующих причин смертности. Частым следствием инфаркта миокарда является омертвление участка сердечной ткани с последующим его замещением на соединительную ткань. Подобные фиброзные поражения являются причиной сердечной недостаточности и фактором риска возникновения аритмий, так как нарушают распространение волн возбуждения. Этиотропной терапии таких состояний на данный момент не существует, поэтому создание имплантатов для регенерации фиброзных рубцов имеет важное значение.

В придании имплантатам сердечной ткани нужного строения основную роль играет искусственный внеклеточный матрикс - опорная часть клеточно-инженерной конструкции. Создание матриксов, придающих ткани требуемую структуру, является одной из главных проблем тканевой инженерии. На данный момент для этой цели

используются ряд подходов. В настоящей работе Балашов В.А. исследует и расширяет границы применения одних из самых перспективных видов подложек в виде полимерных нановолокон и мембран, что является актуальным для развития тканевой инженерии.

Новизна и практическая значимость результатов

Результаты, представленные в работе Балашова В.А., обладают научной новизной и практической значимостью:

- В работе показаны неизвестные ранее взаимодействия неонатальных кардиомиоцитов с полимерными нановолокнами, которые приводят к отличиям в адгезии к подложке кардиомиоцитов и фибробластов и различным степеням обёртывания клетками нитевидных структур. На основе описанных волоконно-клеточных взаимодействий был разработан метод создания трёхмерных сердечных органоидов с нановолоконным полимерным внеклеточным матриксом
- На *in vitro* моделях были показаны возможные способы увеличения эффективности имплантации клеточного материала в миокард. В частности, модельная имплантация светочувствительных клеток в культуру кардиомиоцитов показала, что прикрепление к подложке повышает эффективность образования электрической связи вносимых клеток с окружающей тканью. Разработанные наноподложки в виде фрагментов волокон могут повысить количество клеток в месте инъекции путём повышения их выживаемости.
- В диссертации описана разработка метода визуализации волн возбуждения на основе полимерных мембран, позволяющего проводить исследования в средах культивации в стерильных условиях без токсического воздействия красителей.

Рекомендации по использованию результатов диссертации

Результаты диссертационного исследования Балашова В.А. могут быть использованы при разработке тест систем для доклинических исследований лекарств. Также приведённые результаты нужно учитывать при создании методик имплантации клеточного материала в миокард, например, при вживлении пейсмекерных клеток.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов

Достоверность и обоснованность полученных Балашовым В.А. результатов не вызывает сомнений. В работе применён широкий спектр методов исследования с количеством повторов, необходимых для значимых выводов. Основные результаты диссертации опубликованы в рецензируемых журналах. Выводы настоящей работы соответствуют полученным результатам.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация изложена на 174 страницах и имеет структуру, предъявляемую ВАК к диссертациям на соискание степеней кандидатов наук. Она проиллюстрирована 63 рисунками. Во введении к работе описаны её актуальность, научная новизна, поставлены цель и задачи работы, формулируются положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы достаточно подробный. Он содержит 19 страниц. В нём говорится о последних достижениях тканевой инженерии в целом, о методах и материалах, применяемых в этой отрасли науки для создания трёхмерных тканей и способах исследования работы сердца, применяемых в клеточной инженерии миокарда.

Раздел “Материалы и методы” содержит 16 страниц. В нём приводятся описания используемых методов в части приготовления

полимерных подложек, работы с культурой ткани и исследования полученных образцов.

Раздел с результатами разделён на 3 главы по основному полученному результату. В первой изучаются волоконно-клеточные взаимодействия, в которых участвуют кардиомиоциты и фибробласты, и исследуется роль этого механизма в реорганизации нановолоконной подложки.

Во второй главе модели миокарда в виде культуры неонатальных сердечных кардиомиоцитов используются для поиска подходов, способных повысить результативность доставки клеточного материала в миокард. В частности, исследуются условия, улучшающие выживаемость и образование электрической связи подсаживаемых клеток с окружающей тканью.

В третьей главе описана разработка и исследование эффективности метода картирования волн возбуждения в сердечной ткани на основе тонких полимерных мембран, не требующий применения посторонних химических флуоресцентных зондов.

Диссертация заканчивается формулировкой выводов исследования. В конце приводится список литературы, включающий ссылки на 180 статей.

Вопросы и замечания к работе:

1. На стр.32 автором представлена методика выделения кардиомиоцитов из желудочков крыс. Как измельчали ткань желудочков крыс для выделения? Как избавлялись от клеток других тканей?
2. Указанная автором исходная плотность распределения кардиомиоцитов при культивировании - 100000 кл/см^2 - очень высокая. Почему была выбрана такая плотность? В разделе 1.1.1 описаны результаты

исследований прикрепленных к волокнам клеток, где плотность распределения клеток значительно ниже. С чем связаны такие различия? Измеряли ли плотность клеток на волокнах?

3. На стр.33 автором указан довольно широкий разброс плотности распределения клеток в лунке 24-луночного планшета - 500 тыс.-1 млн. клеток. С чем связан такой разброс? Какую методику подсчета клеток использовали для его определения?

4. В тексте диссертации не указано, какой фуксин использовали для окрашивания срезов кардиальных жгутов, а также не описана методика данного окрашивания. Как и для чего производилось окрашивание и с чем связывается данный краситель?

5. На стр. 56 автор описывает контакты кардиомиоцитов с волокнами без адгезии. На приведенных изображениях все клетки примыкают к волокнам. Как определяли, было ли адгезионное взаимодействие фибробласта и волокна?

6. Для экспериментов по интегрированию клеток ChR2-HL1 в монослой первичной культуры автором были выбраны значения конfluence 75% и 100%. Почему были выбраны данные значения? Проводили ли подобные эксперименты с меньшими значениями?

Общее заключение

Указанные замечания не умаляют значимость диссертационного исследования. Задачи, поставленные в диссертации Балашова В.А., выполнены. Основные результаты опубликованы в 4 статьях в рецензируемых журналах на английском и русском языках и доложены на 9 международных и всероссийских конференциях.

Автореферат даёт достаточно полную характеристику проведённым исследованиям и исчерпывающе отражает основное содержание диссертации.

В целом диссертация Балашова В.А. представляет из себя законченное исследование, содержащее решение актуальных задач, объединённых общим подходом. Работа в полной мере соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор - Балашов В.А. - заслуживает присвоения ему учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - Биофизика.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,

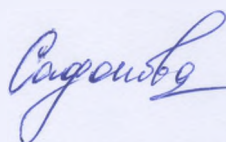
научный сотрудник лаборатории бионанотехнологий

Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Сафонова Любовь Александровна

saf.lyubov.msu@gmail.com

+7 (495) 544-18-00



Подпись к.б.н. Сафоновой Л.А. заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И.Шумакова»

Минздрава РФ, к.м.н.

« 4 » *декабря* 2020г.



Великий Д.А.

Сведения об официальном оппоненте

по диссертационной работе Балашова Виктора Андреевича «Разработка биомиметических моделей сердечной ткани in vitro», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - биофизика.

Фамилия Имя Отчество	Сафонова Любовь Александровна
Ученая степень, отрасль науки, шифр и наименование научной специальности	Кандидат биологических наук, 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы
Ученое звание	
Место работы и занимаемая должность	Научный сотрудник лаборатории бионанотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова», Москва, Россия
Почтовый адрес учреждения	123182, Российская Федерация, г. Москва, ул. Щукинская, дом 1
Адрес электронной почты	saf.lyubov.msu@gmail.com

Телефон рабочий	+7 (495) 544-18-00

Перечень публикаций по профилю диссертации официального оппонента Сафоновой Любви Александровны за последние 5 лет:

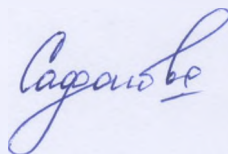
1. Сафонова Л.А., Боброва М.М., Агапова О.И., Котлярова М.С., Архипова А.Ю., Мойсенович М.М., Агапов И.И. Биологические свойства пленок из регенерированного фиброина шелка (2015) Современные технологии в медицине, 7(3), с.6-13, doi: 10.17691/stm2015.7.3.01
2. Соколова А.И., Боброва М.М., Сафонова Л.А., Агапова О.И., Мойсенович М.М., Агапов И.И. Зависимость биологических свойств скаффолдов из фиброина шелка и желатина от состава и технологии изготовления (2016) Современные технологии в медицине, 8(3), с.6-15, doi: 10.17691/stm2016.8.3.01
3. Сафонова Л.А., Боброва М.М., Агапова О.И., Архипова А.Ю., Гончаренко А.В., Агапов И.И. Пленки на основе фиброина шелка для заживления полнослойной раны кожи у крыс (2016) Вестник трансплантологии и искусственных органов, 18(3), с.80-83, doi: 10.15825/1995-1191-2016-3-74-84.
4. Ефимов А.Е., Агапова О.И., Сафонова Л.А., Боброва М.М., Парфенов В.А., Кудан Е.В., Перейра Ф.Д.А.С., Буланова Е.А., Миронов В.А., Агапов И.И. Наноструктурные особенности контактов фибробластов и двухмасштабного биосовместимого полиуретанового матрикса (2016) Российские нанотехнологии, 11(11-12), с.116-119.

5. Efimov A.E., Agapova O.I., Safonova L.A., Bobrova M.M., Volkov A.D., Khamkhash L., Agapov I.I. Cryo scanning probe nanotomography study of the structure of alginate microcarriers (2017) RSC Advances, 7, pp. 8808-8815, doi: 10.1039/C6RA26516B

6. Efimov A.E., Agapova O.I., Safonova L.A., Bobrova M.M., Parfenov V.A., Koudan E.V., Pereira F.D.A.S, Bulanova E.A., Mironov V.A., Agapov I.I. 3D scanning probe nanotomography of tissue spheroid fibroblasts interacting with electrospun polyurethane scaffold // Express Polymer Letters.-2019.-V13.-№ 3. P.632-641. doi: 10.3144/expresspolymlett.2019.53

7. Ефимов А.Е., Агапова О.И., Сафонова Л.А., Боброва М.М., Агапов И.И. Трехмерный анализ микро- и наноструктуры ткани легкого методом сканирующей зондовой нанотомографии // Вестник трансплантологии и искусственных органов. -2020. – Том 22. №3.- С.143-148. doi: 10.15825/1995-1191-2020-3-143-148

Перечень публикаций подтверждаю
Сафонова Л.А.



Подпись к.б.н. Сафоновой Л.А. заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И.Шумакова»
Минздрава РФ, к.м.н.

« 4 » сентября 2020г.



Великий Д.А.