

Отзыв

члена диссертационного совета Екатерины Валентиновны Лопатиной на
диссертацию

Михаила Сергеевича Божокина на тему «Модификация культуры мезенхимных стромальных клеток для клеточно-инженерного замещения дефектов гиалинового хряща», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – Клеточная биология»

Актуальность темы диссертационной работы

Эндопротезирование крупных суставов давно и основательно вошло в практику травматологии и ортопедии как метод лечения посттравматических, воспалительных и дегенеративных повреждений суставов. Ежегодно около 300 тысяч граждан Российской Федерации нуждаются в эндопротезировании крупных суставов. Рост числа оперативных вмешательств с целью установления или ревизии ранее установленного эндопротеза в мире неуклонно растет. Последние 20 лет также ознаменованы внедрением методов и подходов, применяемых при протезировании в клинической практике в практику ветеринарных врачей. Особый интерес для практикующих хирургов представляет развитие и внедрение клеточных технологий в клиническую практику.

Учитывая вышеизложенное, работа М.С. Божокина «Модификация культуры мезенхимных стромальных клеток для клеточно-инженерного замещения дефектов гиалинового хряща» является актуальной.

Научная новизна

Научная новизна представленного исследования не вызывает сомнений.

Проведение исследований потребовало от автора разработки оригинального устройства для создания стандартизированных повреждений

коленного сустава крысы и создания оригинального устройства для совмещения биodeградируемого носителя и культуры клеток. Обе разработки автора диссертационного исследования патентно защищены патентами РФ RU 175628 U1RU и 190863 U1.

М.С. Божокин экспериментально доказал существование возможности применения рекомбинантного белка TGF- β 3, созданной рекомбинантной плазмиды, несущей ген *tgfb3p* для модификации клеточной культуры мезенхимальных стволовых клеток. Впервые в эксперименте осуществлен анализ эффективности низкоинтенсивного когерентного лазерного излучением с длиной волны 632,8 нм при модификации клеточной культуры. В экспериментах *in vivo* получены приоритетные данные по применению модифицированной данными способами клеточной культуры в составе биodeградируемой КИК при имплантации в область созданного повреждения коленного сустава.

Теоретическая и практическая значимость

Представленное автором исследование существенно расширяет имеющиеся представления о процессе восстановления гиалинового хряща после имплантации опытной КИК и экспериментальные подходы для детального изучения этого вопроса. Доказано, что динамика дегенеративных изменений на поверхности гиалинового хряща находится в прямой зависимости от первоначально созданного повреждения. На основе анализа результативности исследуемых методик модификации автор выбрал оптимальный невирусный метод изменения пролиферации клеточной культуры. Доказана нецелесообразность трансфицирования клеточной культуры для использования внутри КИК. Полученная в результате работы КИК с выбранной системой модификации рекомбинантным белком TGF- β 3 в дальнейшем может быть использована для замещения поверхностных дефектов гиалинового хряща у более крупных животных, а также в ограниченной клинической практике.

Структура работы

Диссертация изложена на 127 страницах и состоит из следующих разделов: Оглавление, Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, семь глав Результаты собственных исследований, Обсуждение результатов, Заключение, Список литературы и Приложение. В список литературы включен 228 источник. Работа иллюстрирована семью таблицами и 37 рисунками. Приложение к диссертации содержит 8 страниц.

Во введении автор описывает актуальность работы, ее научную и практическую значимость, постулирует цели, задачи исследования и положения, выносимые на защиту. Обзор литературы призван дать читателю полную информацию о структуре гиалинового хряща, роли цитокина TGF- β 3 в регуляции пролиферации его клеток. Тщательно описаны современные методы и подходы, которые используются для восстановления структуры хрящевой ткани. Раздел материалы и методы посвящен описанию методических приемов, используемых в работе. Методы адекватны для решения поставленных в работе задач. Отдельные разделы посвящены описанию молекулярных и биохимических методов исследования; методам культивирования клеток. Детально описано создание клеточно-инженерной конструкции. Далее следует описание методических приемов, применяемых при модификации клеток. Раздел о воздействии лазерным излучением длиной волны 632,8 нм содержит блок-схему установки, которая использовалась при проведении экспериментов.

Исследование *in vivo* проведено на 36 лабораторных крысах. Для проведения работы автором разработана стандартизированная методика и устройство для создания дефекта гиалинового хряща. В этом разделе автор описывает протокол имплантации КИК экспериментальным животным в область созданного дефекта гиалинового хряща. Экспериментальные животные были разделены на три группы. Контрольную группу составили животные, которые имели только контрольный дефект, без трансплантации КИК. Опытная группа 1 – дефект с последующей трансплантацией КИК в

составе биodeградируемой мембраны и недифференцированных мезенхимных стромальных клеток (МСК) и опытная группа 2 – дефект с последующей трансплантацией КИК в составе биodeградируемой мембраны и клеток, дифференцированных с помощью рекомбинантного белка TGF- β 3.

Гистологические исследования, помимо описания подготовки ткани к исследованию включают описание флюоресцентной и конфокальной микроскопии клеточно-инженерной конструкции. Автор также представляет данные о применении в части экспериментов сканирующей электронной микроскопии.

Завершает Главу общая схема эксперимента на животных для оценки эффективности разработанной КИК с модификацией клеток цитокином tgf- β 3, которая в графическом варианте дает представление о всех этапах эксперимента.

В Главе Результаты дано описание полученных на всех этапах работы результатов экспериментов. Проведенные М.С. Божокиным исследования показали, что модификация клеточной культуры абсолютно необходима для клеточной инженерии гиалинового хряща, а TGF- β 3 является ключевым цитокином, влияющим на пролиферацию клеток в хондрогенном направлении.

При изучении влияния низкоинтенсивного когерентного лазерного излучения с длиной волны 632,8 нм М.С. Божокину удалось оценить хондрогенный эффект. Воздействие лазерного излучения вызывало пиковое увеличение экспрессии генов на сроке 7 суток наблюдения, с заметным снижением при больших сроках (14 и 21 суток). Это было выявлено для генов tgf β 3, sox9, но не для гена col2a1.

Проведенные исследования подтвердили низкую регенеративную способность гиалинового хряща крысы. Экспериментально доказано, что скорость деградации при создании модельного повреждения зависит от

размера первоначально сделанного дефекта. М.С. Божокиным установлено, что регенеративной способностью гиалинового хряща коленного сустава крысы с созданным повреждением 1,2 мм на сроках наблюдения 90 суток можно пренебречь. В качестве параметров повреждения выбран цилиндрический дефект глубиной 0,5 мм и диаметром 1,2 мм.

КИК, разработанная автором, позволила заместить повреждённый участок гиалинового хряща, в том числе на длительных сроках наблюдения. После имплантации такой КИК образовывался устойчивый к внешним нагрузкам регенерат. Модифицированные клетки, по мнению автора работы, позволяют сформировать более устойчивый (более эффективный) регенерат гиалинового хряща.

Глава Обсуждение посвящена анализу и сопоставлению собственных данных автора с уже известными фактами по изучаемой проблеме. Сопоставление эффективности исследованных методов позволило М.С. Божокину выдвинуть ряд предположений по использованию методических приемов, используемых в работе в ограниченной клинической практике.

Раздел Заключение – в сжатом виде суммирует взгляд автора на научную проблему, изучаемую в диссертационном исследовании.

Список литературы содержит 228 источников, источники приведены по мере цитирования автором.

Степень обоснованности и достоверности результатов работы

Обоснованность и достоверность результатов работы М.С. Божокина определяется адекватными объектами и методами исследования и корректной статистической обработкой результатов опытов. Статистическая обработка данных осуществлялась комплексно. Для оценки балльности гистологических и СЭМ изображений по соответствующим шкалам автор использовал критерий Манна-Уитни. Анализ относительного изменения экспрессии генов осуществлен при помощи программ SOFA Statistics для Linux (распространяется бесплатно). Данные представлены как среднее

значение \pm стандартное отклонение не менее четырех независимых экспериментов для каждой отдельной группы, состоящей из трех анализов. Сравнение между группами проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями (ANOVA) с последующим апостериорным тестом Тьюки. Уровень значимости рассматривался при значении $p < 0,05$.

Научные положения достоверны. Результаты работы опубликованы в виде 12 статей, в изданиях индексируемых в базах данных Scopus, WoS, RSCI. Материалы исследования М.С. Божокина представлены на всероссийских и международных симпозиумах, конгрессах и конференциях в виде 10 устных и 2 постерных докладов.

Диссертационное исследование соответствует паспорту специальности 1.5.22 – Клеточная биология.

Замечания

1. Работа в целом оформлена очень небрежно. Восприятию материала мешает большое количество грамматических и стилистических ошибок.

Пример: задача 1. В авторском тексте написано «Оценить возможность эффективность модификации клеточной культуры МСК с помощью низкоинтенсивного лазерного излучения с длиной волны 632,8 нм. Не понятно автор собрался изучать возможность и эффективность, возможность или эффективность? Никаких знаков, позволяющих понять, что автор имеет в виду между словами возможность и эффективность нет.

2. Не понятно, почему в диссертации отсутствует раздел Выводы.

Вопросы

1. Рис.1.1 является авторским? Если нет, то необходимо указать источник.

2. Почему для исследования автор выбрал в качестве объекта для опытов in vivo крыс, а не более крупных лабораторных животных?

Заключение

Диссертационное исследование М.С. Божокина выполнено на высоком методическом уровне и носит мультидисциплинарный характер, имеет существенное научное и практическое значение. Общее позитивное впечатление от сути работы портит крайне небрежное отношение автора к изложению материала.

Диссертация Михаила Сергеевича Божокина на тему: «Модификация культуры мезенхимных стромальных клеток для клеточно-инженерного замещения дефектов гиалинового хряща» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Михаил Сергеевич Божокин заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.22 – Клеточная биология».

Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не обнаружены.

Член диссертационного совета
заведующая кафедрой физиологии нормальной
ПСПбГМУ им.акад. И.П.Павлова МЗ РФ
доктор биологических наук, доцент

 Е.В. Лопатина

21 октября 2022

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П.Павлова Министерства здравоохранения Российской
Федерации

Адрес: Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого 6-8

Тел.: 8-812-338-66-04

Адрес электронной почты: evlopatina@yandex.ru