

Отзыв

официального оппонента доктора медицинских наук Милюдина Евгения Сергеевича на диссертационную работу Кавелиной Анны Станиславовны «Патогенетическое обоснование создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология, в диссертационный совет Д 01.022.05 при Государственной образовательной организации высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького»

Актуальность темы исследования

Представленная диссертационная работа посвящена очень актуальной теме – разработке биоэквивалента поверхностных слоев роговицы. Актуальность данной темы не вызывает сомнений ввиду того, что разработка нового оптимального метода по созданию биоэквивалента поверхностных слоев роговицы позволит создать новые методы лечения патологических состояний роговицы глаза человека. Развивающаяся при многих заболеваниях и травматических поражениях недостаточность лимбальных клеток приводит к тяжелым осложнениям и в 35 -65% случаев к потере зрения. Развитие современных методов лечения, основанных на применении культивированных клеток во многом ограничено не отвечающими строгим критериям скаффолда. Биологическая подложка, используемая при создании тканеинженерного комплекса для лечения патологии роговицы должна отвечать особым требованиям, а именно сохранять биологически активные вещества для поддержания жизнеспособности клеточного слоя, обеспечивать прозрачность и плотное прилегание к подлежащим слоям роговицы.

До сих пор вызывает вопросы использование каких материалов предпочтительно использовать в качестве механической подложки для культивированных клеток. В данной роли биоматериалы выгодно отличаются от синтетических материалов тем что, наряду с физическими обладают биологически активными свойствами. Совокупность механических свойств, биосовместимость, биodeградация и сохранность прозрачности позволяет отдать предпочтение амниотической мембране при создании тканеинженерного комплекса для лечения патологических состояний роговицы. Автор использовала криоконсервированную амниотическую мембрану так как по мнению многих современных исследователей криоконсервация является единственным известным методом, способным обеспечить длительную сохранность жизнеспособных клеток, а также коллагеновой структуры биоматериала.

Таким образом, несмотря на то, что проблема лечения патологии поверхностных слоев роговицы изучалась как отечественными, так и зарубежными коллегами, в настоящее время не существует четкой методики по созданию биоэквивалента поверхностных слоев роговицы. В связи с этим остается актуальным поиск методики поэтапного послойного культивирования лимбальных стволовых клеток на поверхности амниотической мембраны.

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

Сформулированные в диссертационной работе цель и задачи соответствуют исследуемой проблеме, основаны на детальном анализе материала собственного исследования. Правильный подход к формированию методик исследования, необходимый объем экспериментальных исследований с использованием современных методов клеточной биологии и криобиологии: культивирование *in vitro*; программное замораживание; иммуногистохимия; спектрофотометрия; световой, сканирующей и электронной микроскопии; статистического анализа результатов позволил

автору сформулировать ряд научных рекомендаций отличающихся высокой степенью обоснованности и имеющих важное теоретическое и практическое значение для регенеративной медицины, и в частности для создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы. По результатам исследований диссертантом представлено на защиту 5 положений, по существу работы сделано 7 выводов, сформированы 5 практических рекомендаций, позволяющих более точно и широко ориентироваться в вопросах, касающихся создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы и реализации на практике методов лечения поврежденного эпителия роговицы.

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций работы обусловлена достаточным объемом материала, применением комплекса современных методов исследования, адекватно разработанным дизайном исследования, использованием обоснованных подходов к статистической обработке полученных результатов и подтверждается в процессе анализа материала.

Научная новизна исследования и практическая значимость работы

Новизна исследования заключается в разработке получения первичных клеточных культур ЛСК и КПЭ роговицы глаза человека.

Экспериментально установлена принадлежность культивированных лимбальных клеток роговицы глаза человека в монокультуре и в составе многослойного культивирования к компартменту СК лимба.

Проведен сравнительный анализ морфологических особенностей, пролиферативной активности, эффективности колонеобразования в условиях культивирования.

Автором изучена возможность с учетом патогенетических особенностей криоконсервации послойного культивирования ЛСК и КПЭ роговицы человека на обеих сторонах амниотической мембраны.

Впервые проведены иммуногистохимические исследования, дана характеристика амниотической мембране с культивированными ЛСК и КПЭ

роговицы человека в монокультуре и в составе многослойного культивирования.

Практическая значимость работы состоит в разработке патогенетически обоснованной методики создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза (Патенты Украины: №65506, №86892, №87174), обосновании целесообразности криоконсервации ЛСК и КПЭ роговицы глаза человека на поверхности амниотической мембраны.

По результатам комплексного исследования даны рекомендации о целесообразном применении биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека при патологии эпителия роговицы.

Оценка содержания работы

Диссертационная работа построена традиционно, изложена на 151 странице, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 4 глав собственных исследований, анализа и обобщения результатов, заключения, выводов и практически рекомендаций. Список литературы включает 224 источника, в том числе 60 отечественных и 164 иностранных авторов.

В разделе «Введение» автор представляет обоснование актуальности изучаемой проблемы; цели и задачи исследования; положения, выносимые на защиту; научную новизну и практическую значимость работы.

В главе «Обзор литературы» проведен подробный анализ как отечественной, так и зарубежной литературы и, преимущественно, литературы последних лет. Хочется отметить значительное число проанализированным автором работ по теме диссертации, в подавляющем большинстве зарубежных источников, позволивших детально осветить все этапы развития исследований по данной теме.

Вторая глава «Материалы и методы исследования» посвящена подробному описанию методик, исследований которые были проведены в 5 этапов:

1. Разработка выделения ЛСК и КПЭ роговицы человека;

2. Разработка метода получения биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека и изучение его морфологических свойств;
3. Идентификация культур ЛСК и КПЭ в монокультуре и в многослойном культивировании;
4. Проведение криоконсервации биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека;
5. Оценка морфологических свойств биоэквивалента.

Отмечается актуальность и достоверность каждого проведенного исследования.

Описаны методы математико-статистической обработки с использованием лицензионного пакета «MedStart» (версия 3, сер. № MS000027) (Лях Ю.Е., 2006г.) и использованием адекватных методов биостатистики. Количественные характеристики случайных величин представлены в материалах диссертации преимущественно в виде средних значений и стандартных отклонений.

Третья глава посвящена результатам собственных исследований морфофункционального состояния культивируемых клеток роговицы. Автор изучала общие тенденции поведения клеток в культуре, а также отдельные особенности реализации их потенциала *in vitro* в зависимости от вида клеток. В частности, в результате исследования выявлено что клетки, выделенные из зоны палисадов Фогта, являются жизнеспособными и сохраняют плюрипотентность.

Также выявлена высокая пролиферативная и гетерогенная активность клеток переднего эпителия роговицы. Однако выявлены характерные периоды торможения пролиферации на 4 – 5 пассаже, что по мнению автора определяется степенью детерминированности клеток. Данное исследование позволило автору подтвердить важную роль лимбальной зоны как источника новых клеток при посттравматической регенерации эпителия.

В данной главе также исследовались физические и морфологические свойства крио консервированной амниотической мембраны. Автор продемонстрировала на снимках полученных при исследовании биопрепаратов на сканирующем электронном микроскопе сохранность криоконсервированной амниотической мембраны. При изучении прикрепления культивированных ЛСК и КПЭ на поверхности матрикса автор выявила устойчивость данных клеток к процессу криоконсервации. Показано, что используемый способ культивирования клеток роговицы препятствует падению жизнеспособности после криоконсервации. Тем самым разработанная автором методика криоконсервации ЛСК и КПЭ на поверхности АМ в питательной среде DMEM/F12 с содержанием 20% ЭТС и добавлением 10% ДМСО при двухступенчатом программном замораживании, позволяет сохранить ультраструктуру ткани, а также способность ЛСК и КПЭ сохранять их общебиологические и специфические морфофункциональные свойства.

В 4 главе автор изучала **Морфофункциональное состояние культивируемых клеток роговицы на поверхности амниотической мембраны.** Автор в результате выполненных экспериментов установила, что при одинаковом количества посева лимбальных клеток на базальную или стромальную поверхность АМ статистически достоверных различий адгезивных и пролиферативных свойств не выявлено.

Автор также выполнила иммуногистохимический и морфологический анализ состояния созданных тканеинженерных комплексов после криоконсервации по предложенной методике, который подтвердил сохранность морфофункциональных и пролиферативных свойств после криоконсервации.

Заключение где автор кратко подытоживает полученные результаты, лежащие в основе выводов.

Выводы полностью вытекают из проведенных исследований и не вызывают сомнений, так как основываются на достоверных и адекватных методиках с привлечением статистического анализа.

Список литературы содержит достаточное количество имеющих историческое значение, а также современных отечественных и зарубежных источников, оформлен в соответствии с текущими требованиями ВАК, Министерства образования и науки РФ.

В целом диссертационная работа Кавелиной Анны Станиславовны производит хорошее впечатление. Она написана литературным языком и, несмотря на сложность материала, легко читается. Диссертация хорошо иллюстрирована, содержит достаточно наглядных таблиц и рисунков. Обзор литературы содержит критические замечания автора. Выводы вытекают из содержания работы. Принципиальных замечаний по диссертации нет, но имеются вопросы:

1. Анна Станиславовна Вы выполняли посев культивированных клеток как на базальную, так и на стромальную стороны амниотической оболочки – каким образом вами определялась та или иная сторона при выполнении эксперимента?
2. Вы отмечаете сохранность жизнеспособности клеточных структур АМ после размораживания. Какое значение в вашем эксперименте имеют жизнеспособные клетки АМ.

Решение поставленных задач, убедительность и обоснованность выводов диссертации, последовательно вытекающих из представленных материалов, позволяет считать диссертацию Кавелиной А.С. завершенной. Автореферат и опубликованные автором работы в полной мере отражают основные положения, изложенные в диссертации.

Опубликование основных результатов диссертации.

Основные результаты диссертационной работы отражены в 8 журнальных статьях в центральных журналах, рекомендованных ВАК. Оформлено 4 патента на полезную модель. Материалы диссертации доложены и обсуждены на ведущих научно-практических конференциях.

Заключение.

Диссертация Кавелиной Анны Станиславовны «Патогенетическое обоснование создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение актуальной задачи, имеющее значение для офтальмологии. По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (с изменениями №355 от 21.04.2016 г.), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Официальный оппонент

доцент кафедры оперативной хирургии и

клинической анатомии с курсом медицинских информационных

технологий ФГБОУ ВО «Самарский государственный

медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ

доктор медицинских наук

Милюдин Евгений Сергеевич

