

ОТЗЫВ

официального оппонента, профессора кафедры биологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора медицинских наук, профессора Вавиловой Татьяны Павловны на диссертационную работу Мелконян Карины Игоревны «Разработка и применение биопластических материалов на основе внеклеточного матрикса дермы в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств», представленную к защите на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальностям 3.3.3. Патологическая физиология, 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы диссертации

Для нормального функционирования кожного покрова крайне важен его биохимический состав. Благодаря комплексу входящих в состав кожи биополимеров возможны защитная, секреторная, терморегуляторная и сенсорная функции. Основной частью кожи является дерма, внеклеточный матрикс (ВКМ) которой ответственен за прочность и эластичность кожи благодаря белкам коллагену и эластину, а также за удержание воды, процессы клеточной адгезии и пролиферации за счёт протеогликанов и гликопротеинов. Необходимость замещения кожных дефектов возникает при лечении нарушений целостности кожных покровов при острых ранах (дерматобразии, порезы, донорские раны, ожоги первой и второй степени, волдыри, рваные раны, частичные и полнослойные кожные трансплантаты, повреждения кожи после лучевой или стероидной терапии) и хронических ранах (варикозные и пролежневые язвы, язвы при синдроме диабетической стопы). Восстановление подобных дефектов представляют собой существенную медицинскую, социальную и экономическую проблему. Разработка биологических материалов, восполняющих тканевые дефекты и

состоящих из природных биополимеров внеклеточного матрикса достаточно актуальна, так как компоненты ВКМ обеспечивают сигналы, влияющие на адгезию, миграцию, пролиферацию, выживание и дифференцировку различных типов клеток за счет содержания большого количества доменных структур, которые становятся активными после протеолитического расщепления. Кроме того, эти активные фрагменты компонентов ВКМ могут действовать как мощные медиаторы воспаления при повреждении тканей.

При использовании ксеногенных источников тканей требуется децеллюляризации исходных тканей, которая предусматривает различные подходы и обычно включает воздействие химических и биологических агентов, таких как детергенты и ферменты, а также физическое воздействие, которые неизбежно вызывают разрушение ВКМ. При этом все эти вещества по-разному влияют на ткани – органические кислоты разрушают нуклеиновые кислоты и солюбилизируют фосфолипиды цитоплазмы, органические спирты дегидратируют клетки и удаляют остаточные нуклеиновые кислоты и липиды, щелочные растворы денатурируют ДНК, хелатирующие агенты нарушают взаимодействие ВКМ с интегринами, а детергенты – липидно-липидные и липидно-белковые взаимодействия в клеточных мембранах. Ионные детергенты могут удалять гликозаминогликаны и факторы роста из ВКМ и оставлять в тканях остаточные ПАВ, поэтому предпочтение отдается неионным детергентам.

Тем не менее, не существует единой теоретической основы, позволяющей разработать оптимальную методику децеллюляризации тканей, поэтому протоколы децеллюляризации варьируют в широком диапазоне в зависимости от типа тканей.

Таким образом, при разработке новых методов децеллюляризации необходимо сохранить баланс между наличием потенциальных полезных эффектов биологических компонентов ВКМ (активные факторы роста и

низкомолекулярные пептиды, имеющиеся в нативном ВКМ) и отсутствием антигенных детерминант, чему и посвящена диссертационная работа Мелконян Марины Игоревны, научные положения которой имеют важное теоретическое значение и носят прикладной характер для биохимии.

Оценка содержания и качества оформления диссертационной работы

Структура и оформление диссертационной работы соответствуют общепринятым требованиям и стандартам, текст изложен последовательно и логично. Диссертация содержит 222 страниц машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, шести глав собственных исследований, заключения с практическими рекомендациями, выводов, списка литературы и приложений. Диссертация иллюстрирована 13 таблицами и 84 рисунками, список литературы содержит 320 источников, из которых 46 отечественных и 274 зарубежных авторов.

Введение содержит обоснование актуальности и новизны исследования, в нём сформулированы цель и задачи исследования, доказана практическая значимость его результатов, представлены основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы посвящён обзору современных биоматериалов на основе компонентов внеклеточного матрикса, приведено описание большого количества аналогов с их достоинствами и недостатками в части алгоритмов биохимической обработки, а также особенностям процессов регенерации кожи и соединительных тканей при локальном воздействии биопластическими и коллагенсодержащими материалами.

Во второй главе представлен дизайн исследования с описанием методов воздействия на биологические материалы и характеристикой групп

лабораторных животных, также описаны методы исследования, позволившие провести качественную и количественную оценку всех необходимых показателей воспаления и регенерации при экспериментальном использовании разработанных биоматериалов.

Главы 3-8 посвящены подробному описанию результатов собственных исследований. Данные изложены последовательно, сначала описаны результаты сравнительного анализа эффективности двух алгоритмов обработки дермы с целью получения ацеллюлярного дермального матрикса (АДМ) для использования в качестве раневого покрытия, затем была смоделирована ожоговая рана и автором убедительно показана эффективность применения ацеллюлярного дермального матрикса для лечения ожоговых ран в эксперименте.

В последующих главах собственных результатов был достаточно подробно описан модифицированный способ обработки больших лоскутов дермы свиньи для создания ацеллюлярного дермального матрикса, который может быть использован для реконструктивной пластической хирургии, отличающийся большей биомеханической прочностью, что было подтверждено результатами соответствующих испытаний. Данные о разработке дермального гидрогеля на основе гидролизованного коллагена внеклеточного матрикса дермы изложены в такой же последовательности: подробно описан процесс его получения и исследования биологических свойств, а далее результаты экспериментального применения на модели ожоговых ран у мелких лабораторных животных с оценкой изменения содержания про- и противовоспалительных факторов и факторов роста в сыворотке.

В заключении резюмируются полученные данные, которые позволяют утверждать, что детергентно-энзиматическая обработка материала является универсальной, экономически целесообразной и доступной техникой децеллюляризации. Полученные биопластические материалы соответствуют

таким характеристикам как биологическая совместимость, стимулирование коллагеногенеза и ангиогенеза, возможность прорасти окружающими тканями, быть гистологически инертными, сохранять мягкость и эластичность и не деформироваться в процессе заживления.

Таким образом, выводы продемонстрировали, что намеченная цель исследования была успешно реализована путем решения 9 конкретных наукоемких задач с получением результатов, отличающихся бесспорной новизной.

Степень достоверности и новизны полученных автором результатов

Достоверность и обоснованность полученных результатов были обусловлены применением современных прецизионных высокотехнологичных методов научного исследования, достаточным объёмом экспериментальных групп и наблюдений, статистическая обработка данных была проведена с помощью программного решения GraphPadPrism (GraphPad Software Inc) и пакета программ Microsoft Office.

В исследовании Мелконян К.И. впервые разработаны оптимальные методики детергентно-энзиматической и химической обработки дермы свиньи, позволяющие получить природоподобные биологические материалы с сохранением ключевых компонентов ВКМ. Уникальным преимуществом предлагаемой автором технологии является отсутствие необходимости использовать сшивающие химические агенты, обладающие высокой токсичностью.

Также получены новые данные о влиянии разработанных биопластических материалов в эксперименте на локальные репарационные процессы в коже в области её поверхностного повреждения термическим воздействием, что было продемонстрировано также на системном уровне.

Вышесказанное подтверждается патентами, полученными автором на способы моделирования кожной раны у свиней в эксперименте, различные способы обработки и получения дермы свиньи для создания ацеллюлярных дермальных матриксов, которые могут быть использованы в ожоговой и реконструктивной хирургии.

Обоснованность научных положений, результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В ходе выполнения диссертационной работы автором был использован комплекс биохимических, включая биохимические исследования показателей содержания ДНК, общего белка, коллагена I типа, сульфатированных гликозаминогликанов, гиалуроновой кислоты; иммунологических (иммуноферментный анализ, иммуногистохимический анализ); гистологических и микроскопических методов исследования. При оценке качества децеллюляризации дермы на всех этапах разработки новых материалов был использован последовательный подход, заключающийся в поэтапном определении гистологической структуры ткани, наличии интактных ядер, оценки степени вымывания ДНК и, наконец, отсутствия токсического действия оставшихся детергентов на культуре клеток кожи, что позволит в дальнейшем стандартизировать процесс получения разработанных биологических материалов.

Обоснованность полученных автором результатов и выводов обусловлена адекватной математической обработкой полученных результатов.

Научная и практическая значимость результатов исследования, а также рекомендации по их использованию

Полученные данные, изложенные в диссертационной работе, представляют научную значимость, заключающуюся в расширении представлений о воздействии компонентов ВКМ дермы и гидролизованного

коллагена на механизмы регенерации кожи, и могут послужить фундаментальной основой для разработки новых подходов в биохимии и регенеративной медицине.

Полученные результаты могут быть использованы для решения актуальных задач клеточной терапии и регенеративной медицины, так как выделенные из тканей клетки на ранних пассажах культивирования существенно меняют свои функциональные свойства и фенотип из-за различных синтетических полимеров в лабораторном пластике. В связи с чем, разработанные коллагенсодержащие материалы помогут воссоздать естественное микроокружение клеток, которое теряется при переводе клеток из нативной ткани в условия *in vitro*.

Предложенные технологии обработки дермы свиньи также могут быть использованы для разработки альтернативных подходов в терапии травматических повреждений кожных покровов, в ряде случаев могут помочь отказаться от оперативного вмешательства, что имеет большое значение в медицинской практике, а также могут способствовать научно обоснованному поиску и рациональному отбору новых средств для решения проблем реконструктивной хирургии.

Внедрение результатов исследования

Разработанные в диссертации положения внедрены в методическую работу на кафедры ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, в работу хирургических отделений ГБУЗ «ККБ №2», ГБУЗ ККБ СМП; ожоговых отделений ГБУЗ «НИИ – ККБ №1 им С.В. Очаповского», в научную работу лаборатории разработки и изучения новых технологий лечения заболеваний ГБУЗ «НИИ – ККБ №1 им С.В. Очаповского», а также в производство раневых покрытий на предприятие ООО «АБ МЕДИКАЛ».

Полнота опубликования основных результатов исследования

По материалам диссертации всего опубликовано 57 научных работ, из них 31 – в изданиях центральной печати, рекомендованных Высшей

аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации, получено 4 патента на изобретения.

Основные результаты исследований были представлены на 24-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА» (5-9 октября 2020г, Пущино), VIII Международной научной Интернет – конференции: «Физико-химическая биология» (25–27 ноября 2020г, Ставрополь), TERMIS EU (26-29 мая 2020, Манчестер), 2nd UK-Russia Young Medics Conference (6-7 января 2020, Кембридж), XVII научно-практической межрегиональной заочной конференции «Биомедицина и биомоделирование» (26-27 мая 2021 г, Москва), III Всероссийской научно-технической конференции «Состояние и перспективы развития современной науки по направлению «Биотехнические системы и технологии» (27–28 мая 2021г, Анапа), Краевой отчетной конференции грантодержателей Кубанского научного фонда (24-25 июня 2021, Сочи), VII Съезде биохимиков России, X российском симпозиуме «Белки и пептиды», VII съезде физиологов СНГ (3-8 октября 2021г, Сочи), 6th International World Congress THERMIS (15-19 ноября 2021г, Маастрихт), научно-практической конференции с международным участием «БИОХИМИЯ XXI ВЕКА» (26 ноября 2021г, Краснодар), международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию Белорусского государственного медицинского университета (13-17 декабря 2021г, Минск), III Международной конференции «Время научного прогресса» (01 февраля 2022 г., Волгоград), 25-ая Пущинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (18-22 апреля 2022г., Пущино), 1-й круглом столе «Новые полимерные и композиционные материалы: наука и бизнес» (29 июня – 02 июля 2022г., Калининград), Краевой отчетной конференции грантодержателей Кубанского научного фонда (20-22 июня 2022г., Сочи), IX Всероссийской научной молодежной школе-конференции «Химия,

физика, биология: пути интеграции» (20-22 апреля 2022г., Москва), V Национальном конгрессе по регенеративной медицине (23–25 ноября 2022г., Москва), 26-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (9-13 апреля 2023г., Пущино).

Замечания

Диссертация К.И. Мелконян, весьма компактна для такого рода работ, что только подчеркивает способность автора кратко и ясно формулировать свои суждения, заключения и выводы по результатам исследования, анализировать данные мировой литературы.

Положительно оценивая представленную диссертацию в целом, хотелось бы задать уточняющий вопрос автору:

Насколько биохимический состав кожи свиньи соответствует коже человека, и можно ли по предложенным методикам обработать дерму других животных?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Мелконян Карины Игоревны, представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 3.3.3. Патологическая физиология, 1.5.4. Биохимия, является законченной научно-квалификационной работой, в результате которой разработаны уникальные методики детергентно-энзиматической обработки дермы свиньи, позволяющие получить тканезамещающие материалы с сохранением компонентом внеклеточного матрикса, которые могут быть использованы в качестве раневого покрытия и для экспериментальной восстановительной пластики, так как способствуют ранней эпителизации, накоплению цитокератина и ресинтезу коллагена и обладают способностью к биоинтеграции в соединительные ткани.

Диссертационная работа Мелконян Карины Игоревны соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней»,

утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 г. № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения искомой степени доктора медицинских наук по специальности по специальностям 3.3.3. Патологическая физиология, 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

Профессор кафедры биологической химии
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Российский университет медицины»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор медицинских наук,
профессор



Т.П. Вавилова

Подпись профессора Вавиловой Т.П. заверяю:
Ученый секретарь ФГБОУ ВО «Российский
университет медицины» Минздрава России
Заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор



Ю.А. Васюк

127006, г. Москва, ул. Долгоруковская дом 4, телефон 8 (495) 609-67-00
e-mail: msmsu@msmsu.ru

01.07.24

СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте диссертации Мелконян Карины Игоревны на тему «Разработка и применение биопластических материалов на основе внеклеточного матрикса дермы в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям: 3.3.3. Патологическая физиология, 1.5.4. Биохимия (медицинские науки), представленной для защиты в диссертационный совет 21.2.014.02., действующий на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (350063 г. Краснодар, ул. имени Митрофана Седина, дом 4, т. (861)2625018), адрес электронной почты: corpus@ksma.kubannet.ru; адрес официального сайта в сети «Интернет»: <http://www.ksma.ru>)

№	Фамилия Имя Отчество рецензента	Место основной работы (название организации, ведомство, город, занимаемая должность)	Учёная степень (шифр специальности, по которой присуждена учёная степень в соответствии с действующей Номенклатурой специальностей научных работников, № свидетельства)	Учёное звание
1	Вавилова Татьяна Павловна	профессор кафедры биологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации	Доктор медицинских наук, 3.1.7. Стоматология 1.5.4. Биохимия Св-во ДТ №011999 от 17.01.1992 г.	профессор
Перечень научных публикаций в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий или МБД		<p>1. Морфологическая перестройка интимы и молекулярные изменения структуры большой подкожной вены у лиц разных возрастных групп при варикозной болезни / Абдувосидов Х.А., Минаев А.В., Чудных С.М., Чекмарева И.А., Островская И.Г., Вавилова Т.П., Асташов В.В., Алекберова Г.И., Кравченко Е.В., Макеева Е.А. // Медицинская наука и образование Урала. 2022. Т. 23. № 1 (109). С. 7-10.</p> <p>2. Исследование взаимосвязи регенерации альвеолярной костной ткани и состояния пульпы зуба по показателям маркеров ремоделирования в слюне пациентов с пародонтитом / Гасанова З.Т., Янушевич О.О., Вавилова Т.П. // Российская стоматология. 2022. Т. 15. № 1. С. 43-44.</p> <p>3. Количественная и качественная оценка костной ткани пародонта по данным конусно-лучевой компьютерной томографии и показателям слюны / Янушевич О.О., Гасанова З.Т., Рунова Г.С., Вавилова Т.П. // Cathedra-Кафедра. Стоматологическое образование. 2022. № 79. С. 26-29.</p> <p>4. Peculiarities of venous trophic ulcers course in gerontological patients according to local immunity</p>		

and morphological manifestations /Abduvosidov Kh., Chudnykh S.M., Ostrovskaya I.G., Vavilova T.P., Konorova I.L., Chekmareva I.A., Kravchenko E.V., Koroleva Yu.I. // Advances in Gerontology. 2022. T. 12. № 4. С. 433-438.

5. Морфолого-биохимические особенности венозной стенки при варикозной болезни у лиц разных возрастных групп /Абдувосидов Х.А., Чудных С.М., Чекмарева И.А., Минаев А.В., Островская И.Г., Вавилова Т.П., Алекберова Г.И., Кравченко Е.В. // Современные проблемы науки и образования. 2021. № 6. С. 121.

Профессор кафедры биологической химии
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Российский университет медицины»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор медицинских наук,
профессор

Т.П. Вавилова

Подпись профессора Вавиловой Т.П. заверяю:
Ученый секретарь ФГБОУ ВО «Российский
университет медицины» Минздрава России
Заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор



Ю.А. Васюк

10.06.24