

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Мыльниковой Алёны Николаевны

«Разработка микрофлюидной модели кровеносного сосуда для изучения функциональных свойств эндотелиальных клеток», представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология

Актуальность темы диссертации.

Последние две декады интерес к микрофлюидным технологиям возрос многократно, в первую очередь это связано с развитием технологий микропечати, доступностью приборной и реактивной базы, а также широким кругом применения технологии. Микрофлюидика — это область науки, которая описывает поведение микро- и нанообъемов жидкостей в потоке, где основные взаимодействия обеспечиваются ламинарным течением и диффузией. С точки зрения молекулярной биологии, медицины и диагностики микрофлюидика – это возможность сделать шаг в сторону приближения исследований *in vitro* к реальным процессам, протекающим в организме: появление микрофлюидных устройств открыло возможности для совершенствования технологий создания биологических моделей. Активным образом развиваются технологии высокопроизводительного скрининга с применением технологии капельной микрофлюидики. Активно идут разработки микрофлюидных моделей различных тканей и органов, в этой области выделены отдельные поднаправления, например, «орган-на-чипе» и даже «человек-на-чипе». На сегодняшний день с использованием микрофлюидных методов разработан ряд моделей сосудов, однако далеко еще не все фундаментальные процессы, связанные с адаптацией клеток к потоку хорошо изучены, поэтому дальнейшие работы в этой области имеют как большой научный, так и практический потенциал. Научный интерес в этой области также подтверждается растущим числом публикаций по данной теме: более 1200 статей по запросу «blood vessel on the chip», а также существование высокорейтингового журнала «Lab on chip».

Диссертационная работа Мыльниковой Алёны Николаевны посвящена созданию клеточно-тканевой модели кровеносного сосуда с применением микрофлюидных технологий и изучению адаптации выбранной клеточной линии к создаваемым в модели гидродинамическим условиям.

Научная новизна.

Научная новизна представленной работы в первую очередь заключается в том, что впервые была получена воспроизводимая микрофлюидная модель кровеносного сосуда с применением клеточной линии EA.hy926. Эта модель позволяет осуществить контроль таких параметров жизнедеятельности клеток, как выживаемость, степень адгезии, проницаемость клеточных мембран, продукция монооксида азота (NO) и уровень экспрессии белковых факторов, вовлеченных в ответ на клеточный стресс, что позволяет использовать ее для изучения регуляции клеточного гемостаза в условиях потока. Разработанный объект не имеет запатентованных аналогов и имеет потенциал для дальнейшего научного и практического применения. Кроме того, стоит отметить, что в работе представлены данные по увеличению продукции оксида азота в ответ на сдвиговую деформацию, создаваемую потоком среды в модели, что так же было впервые продемонстрировано *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Практическая значимость диссертации очевидна и связана с возможностью использования предложенной микрофлюидной модели эндотелиальной выстилки кровеносного сосуда для изучения влияния гидродинамического режима, создаваемого током крови по сосудам на основные параметры жизнедеятельности эндотелиальных клеток. При этом все отмеченные выводы по критическому выбору подложек полимерной основы, геометрическим параметрам модели могут быть учтены и использованы при проектировании других микрофлюидных моделей органов и тканей на чипе.

Степень обоснованности и достоверности результатов

Представленные в работе результаты получены с использованием современных компьютерных программ и физико-химических методик: микроскопии в проходящем свете, оптической конфокальной микроскопии, зондовой ион-проводящей микроскопии, электронной сканирующей и флуоресцентной микроскопии, спектрофлуориметрии.

Все эксперименты были выполнены на современном оборудовании с корректным использованием методологии научного исследования и в нескольких повторностях.

Результаты исследования интерпретировали на основании статистической обработки полученных результатов, а также согласованностью теоретических результатов и экспериментальных данных, что обеспечивает достоверность количественных оценок и исключает субъективность заключений. В связи с этим положения и выводы по результатам проделанной работы можно считать аргументированными и достоверными.

Апробация работы

Результаты диссертации представлены на международных и всероссийских конференциях, в том числе на 3 международных конференциях: The European Molecular Biology Laboratory Conference «Microfluidics» (EMBL Heidelberg, Germany, 2016); «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2017); «Актуальная биотехнология» (2022); и на 5-й Всероссийской конференции «Фундаментальные основы МЭМС- и нанотехнологий» (2015).

Основные положения диссертации получили полное отражение в 16 печатных работах: 4 статьях в рецензируемых научных журналах, включенных в Перечень ВАК и международные цитатно-аналитические базы (МБД), 7 статьях в иных научных изданиях, 1 патенте и тезисах 4 докладов.

Соответствие паспорту научной специальности

По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям диссертация соответствует паспорту специальности научных работников 1.5.6. Биотехнология (технические науки) по направлениям исследования 3. «Изучение и разработка технологических режимов выращивания культур тканей и клеток растений и животных для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений и других продуктов, изучение их состава и методов анализа, технико-экономических критериев оценки, создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения», 6. «Разработка принципов и алгоритмов для проектирования и создания оптимальных компьютеризированных систем управления биотехнологическими процессами» и 8. «Разработка научно-методических основ для применения стандартных биосистем на молекулярном, клеточном, тканевом и организменных уровнях в научных исследованиях,

контроле качества и оценки безопасности использования пищевых, медицинских, ветеринарных и парфюмерно-косметических биопрепаратов».

Оценка содержания работы.

Диссертационная работа изложена на 143 страницах машинописного текста и включает в себя введение, обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальную часть, выводы, список цитируемой литературы из 120 ссылок. Работа содержит 3 таблицы, 59 рисунков, 13 формул.

Работа представлена в классическом стиле. Во введении дано обоснование актуальности выбранной темы исследования, сформулированы цели и задачи работы, научная новизна и практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту.

В литературном обзоре затронуты все этапы создание микрофлюидных моделей кровеносных сосудов, отмечены как технологические, там и биологические аспекты, которые необходимо учитывать при проектировании, а также перспективы использования подобных моделей в сосудистой биологии.

Вторая глава посвящена обсуждению результатов: затронуты все этапы проектирования устройства, расчет гидродинамических параметров и критический анализ при выборе биосовместимых материала для изготовления модели, подробно описаны изготовление устройства и сборка микрофлюидной стендовой системы. Автор уделил особое внимание оптимизации работы системы и ее каждого отдельного элемента. Вторая часть экспериментальной работы затрагивала демонстрацию ее практического применения. Был проведен анализ влияния гидродинамических параметров на адаптацию эндотелиальных клеток к условиям потока, включая их адгезию, мембранный транспорт флуоресцентных зондов, продукцию монооксида азота (NO), экспрессию GRP78 и фактора Виллибрандта и сопоставление полученных данных с аналогичными, полученными в статических условиях.

В третьей главе дано описание используемых материалов и методов проведения экспериментов.

Последний раздел резюмирует полученные результаты и сделанные на их основе выводы, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам.

Из вышеизложенного следует, что диссертантом проделан достаточный объем работы, а полученные результаты могут иметь прикладной характер и использоваться для каждого из этапов создания биологических моделей в микрофлюидном формате.

Работа характеризуется логичностью построения, аргументированностью основных научных положений и выводов, а также четкостью изложения, написана хорошим научным языком, результаты подтверждаются графическим материалом.

Общие замечания:

В тексте имеются опечатки, в частности на стр. 130 слово «превышало», представляет собой химеру русских и английских символов, но в целом обнаруженные опечатки не портят общее впечатление от работы.

Результаты, представленные на рисунках 29-35 было бы удобнее обобщить и представить в виде сводной таблицы, для более наглядного представления.

Функциональные тесты представлены в основном в виде микрофотографий, однако анализируемые параметры жизнедеятельности можно представить в оцифрованном виде, провести статистическую обработку, что существенно упростило бы их анализ, тем более что современное программное обеспечение позволяет это сделать. Особенно это важно в свете вывода №3, в котором демонстрируется различие в уровнях экспрессии белка GRP78 и фактора Виллебранда. Исключением является анализ продукции NO, однако и в этом тесте не совсем ясно в каком количестве повторностях был проведен эксперимент.

Показано, что подложки на основе PDMS и стекла после обработки коллагеном обладают сходными характеристиками по показателю адгезии клеток, почему автор использовал вариант PDMS/стекло, а не PDMS/PDMS, где наблюдаемые функциональные тесты были бы более корректны, так как отличий в поведении клеток на поверхности между одинаковым материалом очевидно меньше, чем между двумя разными?

Заключение

Сделанные замечания не снижают ценность диссертационной работы и значимость полученных результатов.

Диссертационная работа Мыльниковой А.Н. «Разработка микрофлюидной модели кровеносного сосуда для изучения функциональных свойств эндотелиальных клеток»

соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утв. постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 в действующей редакции), а ее автор Мыльникова Алёна Николаевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

член-корреспондент РАН, доктор химических наук, специальность 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), заместитель директора по науке, главный научный сотрудник Лаборатории химии протеолитических ферментов Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

06.12.2024г.



Смирнов Иван Витальевич

Тел. +79267397865

E-mail: smirnov@ibch.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН), Москва, Россия

117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10

(495) 335-01-00

office@ibch.ru