

ФМБА РОССИИ

**Федеральное
государственное бюджетное учреждение
«Федеральный научно-клинический центр
физико-химической медицины
имени академика Ю.М. Лопухина
Федерального медико-биологического
агентства»
(ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина
ФМБА России)**

119435, Москва, ул.Малая Пироговская, д.1А
Тел. (499) 246-77-21 Факс (499) 246-44-09
<http://www.rcpcm.org>, e-mail: niifhm@fmbamail.ru

31.10.2024 № 8/н
На № _____ от _____



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
Федерального государственного
бюджетного учреждения
«Федеральный научно-клинический
центр физико-химической медицины
имени академика Ю.М. Лопухина
Федерального медико-биологического
агентства», д.б.н.
М.А. Лагарькова

«31» октября 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения
«Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического
агентства»

(ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России)

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 диссертационной работы

В настоящее время активно развивается направление создания компактных и многофункциональных устройств, которые могут служить биологическими моделями тканей и органов для изучения нормальных и патологических процессов. Одной из ключевых задач при разработке таких моделей является поддержание гидродинамических условий, приближенных к физиологическим. Это связано с тем, что гидродинамические условия влияют в том числе на фенотип клеток.

В микрососудистом русле обычно наблюдается ламинарный режим течения жидкости, в отличие от статических и турбулентных условий, которые характерны для традиционных методов культивирования. Для решения подобных проблем могут применяться микрофлюидные технологии.

Микрофлюидика позволяет приблизить исследования *in vitro* к реальным процессам в организме, получить более точные результаты и снизить затраты. Создание микрофлюидных моделей органов и тканей на чипе помогает решать как фундаментальные, так и прикладные задачи, такие как проверка действия лекарственных препаратов и биосовместимости имплантов в сердечно-сосудистой хирургии.

Одним из перспективных направлений развития микрофлюидных технологий является создание биологических моделей кровеносных сосудов. Уже разработано несколько моделей сосудов, но фундаментальные процессы, связанные с адаптацией клеток к потоку, остаются до конца ещё не изучены, что открывает широкие возможности для научных исследований и практического применения. Диссертационная работа Мыльниковой Алёны Николаевны посвящена созданию клеточно-тканевой модели кровеносного сосуда с применением микрофлюидных технологий и изучению свойств клеточной линии в условиях предложенной модели.

Научная новизна исследования

В диссертационной работе впервые получена микрофлюидная модель кровеносного сосуда с применением клеточной линии EA.hy926. Согласно представленным данным разработанный объект имеет достаточно широкий потенциал для научного и практического применения, в том числе в клинических испытаниях доставки лекарственных веществ в клетку и биосовместимости сосудистых имплантов. Другие научно-технические результаты, обладающие новизной и важностью в работе не представлены.

Практическая значимость

Практическая значимость диссертации обусловлена 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.

Предложенные исследования по оптимизации геометрии устройства, критический выбор топологии и полимерной основы, метода модификации поверхности микрофлюидного устройства и оптимизированный протокол культивирования клеток в микроканале могут быть в дальнейшем использованы при проектировании других микрофлюидных моделей органов-на-чипе.

Структура и содержание работы, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы. Работа изложена на 143 страницах текста, содержит 59 рисунков, 13 таблиц. Список литературы включает 120 источников.

В разделе **«Введение»** обосновывается актуальность темы исследования, приведены цели и задачи исследования, указаны научная новизна и практическая ценность, сформулированы положения, выносимые на защиту, отмечен личный вклад автора.

Первая глава посвящена анализу современного состояния микрофлюидных технологий. Представлена классификация технологий, применяемых для изготовления микрофлюидных устройств. Обоснован выбор оптимальной геометрии и гидродинамического режима для будущего устройства. Описаны фенотипические и морфологические особенности эндотелиальных клеток, в том числе затронуты физиологические аспекты адаптации клеток к потоку жидкости, большинство из которых на данный

момент до конца не изучены, и перспективы дальнейших исследований в данной области.

Во второй главе приведены основные этапы создания микрофлюидной модели микрососудистого русла. Подробно описано проектирование оптимальной геометрии с помощью программы для автоматизированного проектирования, расчет гидродинамических параметров с помощью компьютерной программы SolidWorks, подбор материалов с учетом специфики клеточной линии EA.hy926, изготовление устройства методом мягкой литографии и сборку стендовой микрофлюидной системы. Данные, полученные в результате проектирования микрофлюидной модели участка кровеносного сосуда, легли в основу полезной модели No199234 – Проточный чип для моделирования участка сосудистого русла для испытания имплантатов и оборудования для сердечно-сосудистой хирургии.

Проведена оценка продукции оксида азота эндотелиальными клетками EA.hy926 при механическом стрессе, создаваемом потоком в микрофлюидной системе. Показано, что микрофлюидная модель эндотелиальной выстилки кровеносного сосуда, предложенная в данной работе, может быть использована для изучения влияния гидродинамического режима, создаваемого током крови по сосудам, на основные параметры жизнедеятельности эндотелиальных клеток таких как выживаемость, степень адгезии, проницаемость клеточных мембран, продукцию монооксида азота (NO) и уровня экспрессии белковых факторов, вовлеченных в ответ на стрессовое воздействие на клетку, что позволяет использовать ее для изучения регуляции клеточного гомеостаза (биологии эндотелиальных клеток) в условиях потока.

В третьей главе приведены предложенные методики приготовления образцов подложек, включающих PDMS, MS-1002, полистирол и покровное стекло с последующей модификацией поверхности (обработка плазмой, коллагеном). Описан процесс изготовления микрофлюидного устройства методом мягкой литографии, его сборки и подготовки для культивирования

клеток. Представлены несколько методик с использованием микроскопии для оценки степени адгезии клеток к субстрату. Приведены методы спектрофлуориметрии и непрямой иммунофлюоресценции для определения влияния сдвиговой деформации, создаваемой в микрофлюидной системе, на продукцию клетками монооксида азота, а также экспрессию GRP78 и фактора Виллебранда.

Раздел **«Заключение»** 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, получены новые практические знания, которые, несомненно, могут иметь прикладной характер и использоваться в дальнейших разработках.

Достоверность и обоснованность положений и выводов диссертации

Диссертационная работа выполнена с использованием достаточного количества результатов экспериментальной работы. На основании полученных данных диссертантом сделаны обоснованные выводы.

Освещение диссертации в научной печати

Результаты работы и защищаемые положения прошли апробацию на пяти российских и международных конференциях. Автором опубликовано по теме диссертации 15 печатных работ, среди которых 9 статей в изданиях, включенных в список ВАК РФ, 5 тезисов конференции, из которых одни в Scopus. Автором был получен один патент на полезную модель. Публикации соискателя отражают содержание диссертационной работы и подтверждают его личный вклад в проведенные исследования.

Замечания и вопросы к содержанию диссертационной работы

В тексте диссертационной работы встречаются неизбежные при таком объеме текста опечатки и неудачные выражения, которые не относятся к научной сути работы.

В то же время, имеются замечания и к основному содержанию работы:

1) Положения, выносимые на защиту, не соответствуют требованиям, предъявляемым к диссертационным работам, и скорее отражают положения, используемые для достижения целей работы. Положения, выносимые на защиту, должны отражать результаты и выводы, сделанные диссертантом, а также иметь научную новизну и 100%-ную оригинальность.

2) В тексте диссертации отсутствуют упоминания коллег, с которыми были выполнены те или иные этапы исследования. Между тем, судя по публикациям, на которые ссылается диссертант, в некоторых разделах, работы проводились совместно с другими исследователями. Благодарности, указанные отдельным пунктом, не являются сопоставимым обозначением причастности к выполнению данной работы.

3) В работе не уделено достаточно внимания техническим аспектам выполнения работы, созданию микрофлюидного устройства. Автор плохо владеет информацией о методах изготовления описываемой им матрицы для ПДМС отливки, особенностях литографии и технических вопросах микрофабрикации.

4) Публикация D. Zaychenko, M. Mesitov, R. Soldatov, A. Mylnikova, D. Kolesov, A. Sokolovskaya, A. Kubatiev, A. Mironov, A. Moskovtsev Post-transcriptional regulation of cellular response to unfolded proteins: tiRNA

involvement //FEBS JOURNAL, 283 s.1, pp.207-208 (Impact Factor: 4.237), представленная автором в разделе статей, является тезисами конференции и должна индексироваться как тезисы. Стоит также отметить, что сама библиографическая ссылка дана неверно (правильно: M. Mesitov, R. Soldatov, A. Mylnikova, D. Kolesov, D. Zaychenko, A. Sokolovskaya, A. Kubatiev, A. Mironov, A. Moskovtsev. Post-transcriptional regulation of cellular response to unfolded proteins: tiRNA involvement. The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) pp.207–208 DOI: 10.1111/febs.13808)

Сделанные замечания не снижают ценность данной работы и значимость полученных в ней результатов.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным требованиям

Диссертационная работа Мыльниковой Алёны Николаевны «Разработка микрофлюидной модели кровеносного сосуда для изучения функциональных свойств эндотелиальных клеток» является самостоятельной научно-исследовательской квалификационной работой, посвященной разработке кровеносного сосуда-на-чипе с потенциальной возможностью внедрения в практику. Тема и содержание диссертационной работы полностью соответствует выбранной специальности 1.5.6 – «Биотехнология».

По научной новизне, актуальности, объему и обоснованности научных результатов диссертация отвечает требованиям, изложенным в п. 9 Положения ВАК РФ «О присуждении ученых степеней», (утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а ее автор, Мыльникова Алёна Николаевна, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата технических наук.

Отзыв обсужден и одобрен 24.10.2024 на расширенном семинаре Центра технологий и микрофабрикации и Центра молекулярной медицины и диагностики ФГБУ «Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства» и утвержден протоколом №2 от 25 октября 2024г.

Руководитель Центра технологий и микрофабрикации ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Басманов Дмитрий Викторович

Кандидат биологических наук, руководитель Центра молекулярной медицины и диагностики, заведующий лабораторией молекулярной медицины ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Беспярых Юлия Андреевна

Адрес: Россия, Москва, 119435, Малая Пироговская, д. 1а
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства».

Сайт: <http://rcpcm.org/>

тел.: +7 499 2469165; e-mail:

Подпись Басманова Д.В. и Беспярых Ю.А. заверяю.



Начальник отдела кадров ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Н.А. Васильева

«31» октября 2024 г.