

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.

Разработка микрофлюидных устройств для культивирования клеток животных является значительным шагом в приближении условий окологлобального микроокружения *in vitro* к условиям *in vivo*. Микрофлюидные системы представляют интерес не только для исследования влияния фармпрепаратов на клетки в условиях потока окологлобальной среды, но и в целом для создания тканеподобных культур *in vitro*, в которых состояние клеток приближено к условиям организма. Такие модели вызывают интерес как для создания экстракорпоральных биоискусственных органов, например биологическая искусственная печень, созданная в ИТЭБ РАН ранее, так и для разработки системы взаимодействующих моделей различных органов человека (*human on a chip*). Большой интерес к микрофлюидным системам имеется в области иммунологии, поскольку действие иммунопрепаратов на лабораторных животных часто недостаточно информативно по отношению к организму человека в силу различий иммунных систем человека и животных на молекулярно-клеточном уровне. Формирование тканеподобных культур *in vitro* невозможно без моделирования перфузионно диффузионного массообмена с питательной средой. В связи с этим возникает множество междисциплинарных задач, требующих понимания физических, биофизических процессов в микрофлюидных системах, понимания биологии клетки в целом и биологии клетки в культуре. История этого направления длится не менее 60 лет, начиная с 60-х годов 20 в, когда, в частности, Крузе и соавторы обнаружили многослойный рост клеточных культур в условиях микропотоков культуральной среды. За это время в данной области было выполнено множество удачных работ, разработаны различные модели биоискусственных органов, тканей, однако остается множество фундаментальных вопросов и нерешенных задач. Современные публикации показывают необходимость и

высокую актуальность продолжения работ в этом направлении. и в частности, в изучении влияния микропотоков околоклеточной среды на физиологию клеток, а также в создании микрофлюидных моделей кровеносных сосудов. Диссертационная работа Мыльниковой Алёны Николаевны выполнена именно в этом направлении, и включает как разработку клеточной модели кровеносного сосуда с применением микрофлюидных технологий. так и изучению влияния гидродинамических потоков питательной среды в этом устройстве на состояние эндотелиоцитоподобных клеток (линия EA.hy926) человека.

Научная новизна.

Научная новизна представленной работы в первую очередь заключается в том, что, используя эндотелиоцитоподобную линию клеток человека EA.hy926, моделирующих сосудистый эндотелий, была разработана воспроизводимая микрофлюидная модель кровеносного сосуда.

Автором проведен критический анализ при выборе подложек для клеток, для полимерной основы микрофлюидной камеры и метода модификации ее поверхностей, а также оптимизированы геометрия каналов для культивирования клеток и каналов ввода/вывода питательной среды и протокола культивирования для длительного жизнеобеспечения клеток в разработанной микрофлюидной модели. Разработанный объект не имеет запатентованных аналогов и имеет потенциал для дальнейшего научного и практического применения. Кроме того, данную модель можно рассматривать в качестве возможного инструмента для скрининга при клинических испытаниях вазоактивных веществ и биосовместимости материалов для изготовления сосудистых имплантов. В работе представлены данные по увеличению продукции оксида азота клетками в ответ на напряжение сдвига, создаваемого потоком среды в модели, что так же было впервые продемонстрировано *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Практическая значимость диссертации обусловлена потенциалом применения предложенной микрофлюидной модели эндотелиальной выстилки кровеносного сосуда для изучения влияния гидродинамических режимов потоков

крови в сосудах на жизнедеятельность эндотелиальных клеток и для изучения влияния препаратов на повышении устойчивости эндотелиальных клеток к стрессовым воздействиям. Предложенные исследования по оптимизации геометрии устройства, критический выбор топологии и полимерной основы микрофлюидного устройства, метода модификации его поверхности и оптимизированный протокол культивирования клеток в микроканале могут быть в дальнейшем использованы при проектировании других микрофлюидных моделей органов и тканей на чипе.

Степень обоснованности и достоверности результатов

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

Работа прошла апробацию как на всероссийских, так и международных конференциях. 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.

Во введении дано обоснование актуальности выбранной темы исследования, сформулированы цели и задачи работы, её 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, так 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 эндотелиоподобных клеток к

условиям потока питательной среды над ними, включая их адгезию, проникновение в них флуоресцентных зондов, продукцию клетками монооксида азота (NO), экспрессию белка 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 вышесказанного следует, что диссертантом проделан достаточный объем работы, а полученные результаты могут иметь прикладной характер и использоваться для каждого из этапов создания микрофлюидных клеточных и тканеподобных моделей *in vitro*.

Работа характеризуется логичностью построения, четкостью изложения, написана хорошим научным языком, текст проиллюстрирован рисунками, что облегчает анализ полученных результатов. В тексте имеются опечатки, допустимые при таком объеме текста, что не портит общее впечатление от работы.

Вопросы и замечания к работе:

К диссертационной работе имеется ряд вопросов и замечаний.

1. Первое замечание касается представления модели микрофлюидного устройства на рис. 1 в автореферате и в диссертации. Из этого рисунка трудно понять, куда вводятся клетки, как подается среда, и подпись к рисунку не устраняет вопросы, как и рис. 5 и рис. 6 в автореферате и в диссертации, на которых изображены схемы установок. Для понимания не хватает детального чертежа микрофлюидного устройства с подробным описанием.
2. По ходу всей диссертации автор использует как синонимы понятия сдвиговая деформация и напряжение сдвига, но это совершенно различные понятия. В диссертации выполнен расчет напряжений сдвига в канале, возникающих при движении жидкости в нем, в ед. Па, но не сдвиговой деформации (чего?). Это создает впечатление путаницы использования терминов.

3. На рис. 2 автореферата и в диссертации представлены тепловые карты величины напряжения сдвига в потоке жидкости в канале в зависимости от удаления от поверхности канала. На самом рисунке и в подписи не указано, на каком расстоянии вычислены указанные напряжения сдвига, но в тексте говорится, что согласно рисунку, в канале «наблюдается параболический профиль распределения скоростей потока». Из представленной тепловой карты такой вывод не следует, поскольку не указаны расстояния от поверхности канала, для которых вычислены напряжения сдвига. Понятно, что у автора есть такие данные, но они не приведены.

4. В диссертации говорится о напряжении сдвига достигающем 6 Па в центре канала при потоке жидкости 400 мкл/мин. Однако интерес вызывает напряжение сдвига, которое действует непосредственно на клетку, т.е. на расстоянии 3-6 мкм от поверхности канала. Очевидно эти данные у автора есть, но не удалось их найти ни в автореферате, ни в диссертации. Такие данные интересны хотя бы потому, что позволяют оценить, какие реальные пристеночные сдвиговые напряжения приводят к изменению состояния клетки, к ее гибели при больших скоростях потока среды в канале. Может ли автор сказать, какие величины напряжения сдвига среды на расстоянии 3-6 мкм от поверхности канала при скоростях потока среды 1 мкл/мин и 400 мкл/мин?

5. В диссертации рассмотрены различные варианты устройств подачи среды для микрофлюидных систем и выбраны шприцевые системы. Такие системы могут быть удобны при небольшой длительности экспериментов, но при работе длительностью недели-месяцы и при использовании циркуляции питательной среды надежнее и проще использовать другие насосы. В частности, в работе говорится, что перистальтический насос создает пульсации и тем неудобен. Однако пульсации перистальтического насоса можно сделать несущественными за счет простых устройств демпфирования, используя эти же устройства для оксигенации и поддержания pH среды. Такой подход активно используется. Кстати, слова о нежелательности пульсирующего потока в микрофлюидной системе очень спорны, поскольку движение крови в организме происходит в пульсирующем ламинарном режиме, а использование пульсирующего режима перфузии позволяет в 5-6 раз

увеличить рост клеток гибридомы в волоконном микрофлюидном биореакторе (патент РФ. ИТЭБ РАН)

6. При культивировании использовали 20 мМ органического буфера Хепес в среде для поддержания рН. Такое содержание буфера Хепес нежелательно для длительного культивирования клеток, поскольку приближается к токсической дозе и способно влиять на физиологическое состояние клеток, в частности на гомеостаз внутриклеточного кальция. Для длительного и более физиологического культивирования следует использовать бикарбонатный буфер (20 мМ NaHCO_3), как в плазме крови, а также использовать в рециркуляционном контуре сосуд для оксигенации и поддержания рН среды (как легкие).

7. Предположение о том, что в условиях сдвигового напряжения происходит изменение проницаемости клеточной мембраны, что создает перспективы для доставки в клетку веществ, которые не проникают в нее без воздействия напряжения сдвига, выглядят очень сомнительно. Это предположение сделано на основе данных по усилению окраски клеток флуоресцентными красителями, не проникающими в живые клетки. Однако в таком случае базовая интерпретация полученного результата состоит в том, что при больших скоростях движения среды над клетками начинается их гибель, и тот же пропидиум иодид проникает в погибшую клетку и связывается с ДНК. В работе не приводятся экспериментальных оснований для того, чтобы говорить, что пропидиум иодид или флуоресцентизотиоцианат начинают лучше проникать в живые клетки. Данные о повышении экспрессии и выходе из клеток фактора фон Виллебрандта и активации продукции оксида азота при больших скоростях потока среды над клетками также могут указывать на повреждающее действие напряжения сдвига и формирование адаптивного ответа эндотелиоподобных клеток в процессе этого действия, пока клетки еще не погибли. В целом эти результаты несмотря на некоторые шероховатости интерпретации указывают на успешную биологическую апробацию разработанной клеточной микрофлюидной модели кровеносного сосуда и его перспективность для фундаментальных и прикладных исследований. Т.е. по сути этот главный вывод работы остается правильным.

Представленные выше вопросы и замечания не только не снижают ценность и актуальность диссертационной работы и значимость полученных результатов, но и подчеркивают интерес к ней, высокие перспективы ее применения в исследованиях.

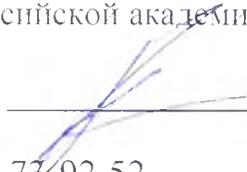
Заключение

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:

Доктор физико-математических наук по специальности 03.00.02 Биофизика, профессор, заведующий лабораторией тканевой инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

05.12.2024 г.



Акатов Владимир Семёнович

Тел. +7 (4967) 73-92-19, +7(4967) 73-92-52

E-mail: akatov.vladimir@gmail.com

Подпись Акатова Владимира Семёновича удостоверяю

Ученый секретарь ИТЭБ РАН, к.б.н.  Т.А. Перевязова
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук
142290, г.Пушино Московской обл., ул. Институтская, 3
(495) 632-78-69
(4967) 73-25-80
dir_iteb@mail.ru

