

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу
Щоткіної Наталії Володимирівни
на тему «Біоінженерні основи отримання ліофілізованого
тканинномодифікованого біосумісного матриксу для використання у
кардіохірургії»,
представлену на здобуття ступеня доктора філософії
в галузі знань 16 – Хімічна та біоінженерія
за спеціальністю 163 – Біомедична інженерія

Актуальність теми дисертації

Дисертаційну роботу присвячено обґрунтуванню технології виробництва ліофілізованого тканинномодифікованого біосумісного матриксу на основі перикарду великої рогатої худоби (ВРХ), який може застосовуватися в кардіохірургічній практиці.

Актуальність даної роботи обумовлена високою необхідністю проведення кардіохірургічних операцій по імплантації протезів серцевого клапана пацієнтам з дефектами в даному органі. Кількість хворих, що потребують оперативного втручання, з кожним роком зростає. Використання закордонних матеріалів на сьогодні ускладнена ще і ситуацією у країні. Тому виробництво вітчизняного продукту, а саме тканинномодифікованого біосумісного матриксу на основі ксенотканини, що володіє антикальцифікаційними властивостями, показав високі біосумісні показники при імплантації лабораторним тваринам та стане конкурентною альтернативою закордонним аналогам як у функціональному, так і в економічному розрізі. Також важливим аспектом є особливості умов зберігання та термін придатності біоімплантів створених на основі позаклітинного матриксу. Одним з найкращих на сьогодні методів зберігання біопротезу є ліофілізація децелюляризованого матриксу. Ліофілізований матеріал зручніший у використанні, зокрема у моделюванні стулок та заплат складної геометрії. Проте важливою умовою є відсутність негативного впливу процесу ліофілізації на стабільність тканини, що потребує більш наукового вивчення параметрів процесу. Таким чином, актуальність даної роботи обумовлена необхідністю стандартизації процесів стерилізації і ліофілізації біопродукту, що володіє складними біоконструкціями колаген-еластинового каркасу, збереження мікроархітекτονіки якого є основою для проведення успішної імплантації та післяопераційної реабілітації, адже такий матрикс стає частиною органу чи тканин пацієнта, на який рецелюляризуються клітини організму людини.

Створення унікальної технологічної схеми виробництва біоімпланту дозволить сертифікувати виріб медичного призначення і прискорить процес застосування його в кардіохірургічній практиці.

Дисертація Щоткіної Наталії Володимирівни присвячена вирішенню важливого завдання – стандартизації схеми виготовлення тканиномодифікованого імпланту, що буде безпечним та перспективним для використання у кардіохірургічній практиці.

Оцінка обґрунтованості наукових результатів дисертації, їх достовірності та новизни

Наукова новизна результатів дисертаційного дослідження полягає в наступному:

За результатами проведеної роботи було розроблено вперше в Україні добре відтворюваний технологічний протокол отримання біоімпланту виготовленого на основі децелюляризованого матриксу великої рогатої худоби для використання в кардіохірургії без застосування глютаральдегіду. У результаті проведених експериментальних досліджень також було експериментально доведено високу ефективність розробленої технології, безпечність отриманого біоматеріалу *in vitro* та його біосумісність *in vivo*.

Досягнення автором мети дослідження – біоінженерне обґрунтування технології виробництва ліофілізованого тканиномодифікованого біосумісного матриксу на основі перикарда великої рогатої худоби – реалізовано в повному обсязі як результат виконання поставлених завдань відповідно до програми дослідження.

Використання сучасних методів дослідження для виконання поставлених задач дисертаційної роботи відповідно до спеціальності 163 – Біомедична інженерія, а саме групи методів: біотехнологічні, мікроскопічні, гістологічні, фізико-механічні, фізичні, мікробіологічні, статистичні, забезпечили достовірність та адекватність отриманих результатів досліджень і обґрунтованість висновків до них.

Репрезентативність проведеного дослідження підтверджується аналізом достатнього за об'ємом фактичного матеріалу, використаного автором на кожному запланованому етапі.

Отже, в дисертаційній роботі поставлене наукове завдання виконано повністю, здобувач повною мірою оволодів методологією наукової діяльності.

Оцінка змісту дисертації, її завершеність та дотримання принципів академічної доброчесності

За своїм змістом дисертаційна робота здобувача Щоткіної Н.В. повністю відповідає Стандарту вищої освіти зі спеціальності 163 – Біомедична інженерія

та напрямкам досліджень відповідно до освітньої програми «Біомедична інженерія».

Дисертаційна робота є завершеною науковою працею і свідчить про наявність особистого внеску здобувача у науковий напрям регенеративної медицини та біомедичної інженерії.

Розглянувши звіт подібності за результатами перевірки дисертаційної роботи на текстові співпадіння, можна зробити висновок, що дисертаційна робота Щоткіної Наталії Володимирівни є результатом самостійних досліджень здобувача і не містить елементів фальсифікації, компіляції, фабрикації, плагіату та запозичень. Використані ідеї, результати і тексти інших авторів мають належні посилання на відповідне джерело.

Мова та стиль викладення результатів

Дисертаційна робота написана українською мовою.

Аналізуючи окремі розділи дисертаційної роботи Щоткіної Н. В. слід відмітити наступне, дисертація має класичну структуру і складається зі вступу, аналітичного огляду наукової літератури, матеріалів і методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, висновків, списку літератури, який містить 160 джерел, з яких 152 – зарубіжні. Дисертаційна робота викладена на 191 сторінці друкованого тексту (з них обсяг основного тексту – 128 сторінок), 23 таблиці і 13 рисунків, з яких 5 мікрофотографії.

У розділі «Вступ» автор обґрунтував актуальність обраної теми, зв'язок з науковими програмами, мету, завдання, предмет, наукову новизну, теоретичне та практичне значення одержаних результатів досліджень. Представлено особистий внесок автора, апробацію результатів дисертації, публікації.

У Розділі 1 представлено аналіз літературних даних щодо сучасних основ біоінженерних технологій виготовлення тканиномодифікованих біоімплантів на основі ксенотканини та сучасних підходів до ліофілізації продуктів біологічного походження та методів їх стерилізації. Дисертантом проаналізовано та коротко і зрозуміло представлено основні положення за напрямком роботи, що свідчить про здатність критичного мислення та високу обізнаність із даної теми. Суттєвих зауважень до огляду літератури немає.

У Розділі 2 описані матеріали та методи, що використовувалися для проведення досліджень. Багатий методичний арсенал, яким володіє дисертант, повністю забезпечує виконання роботи на високому методологічному рівні відповідно до визначеної мети та завдань.

У Розділі 3 представлений аналіз даних наукових досліджень, що обґрунтовують параметри оптимізації тривалості виробництва тканиномодифікованого матриксу із перикарду великої рогатої худоби. Автором було проведено детальний аналіз всіх етапів виготовлення

децелюляризованого позаклітинного матриксу. На основі отриманих даних було оптимізовано технологічну схему виготовлення біоімпланту зі зміненими умовами процесингу, а саме температурний режим та тривалість кожного з етапів децелюляризації, що забезпечує повне видалення антигенних компонентів.

У даному розділі автором представлені дані результатів експериментальних досліджень, на основі яких автору (Щоткіній Н. В.) вдалося оптимізувати тривалість виробництва тканинномодифікованого матриксу із перикарду великої рогатої худоби. Цього вдалося досягти шляхом зниження температурного режиму процесу децелюляризації до $+4^{\circ}\text{C}$ та залучення додаткового процесу перемішування при осмотичному лізису клітин. Таким чином, вдалося значно скоротити час експозиції матеріалу із 48 діб до 16 діб. Така оптимізація є важливим процесом, адже зменшується ризик структурних змін та пошкодження колаген-еластинового каркасу матриксу за рахунок збереження цілісності волокон тканини. Ефективність такої оптимізації підтверджено гістологічно та мікроскопічно. За допомогою аналізу мікроструктури мікроскопії гістологічних зображень зафарбованих гематоксилін-еозином та фотоскануючої електронної мікроскопії підтверджено відсутність будь-яких змін у структурі колагену. Також використання гістологічного методу дозволило автору оцінити ступінь очистки матриксу від клітин та ступінь структурних змін колагенових волокон. А якісний мікроструктурний аналіз СЕМ-зображень також підтвердив відсутність очевидних змін в структурі та розподілі між колагеновими та еластиновими волокнами децелюляризованого позаклітинного матриксу, що представлено на рис. 3.2 дисертаційної роботи. Також представлені дані щодо дослідження пружно-міцносних властивостей матриксу, що продемонстрували більш високі показники порівняно з нативним перикардом. Результати даного дослідження забезпечили можливість отримати скафолд з ксенотканини, який за своїми біомеханічними та біологічними характеристиками подібний до нативного перикарду ВРХ.

У Розділі 4 представлено аналіз даних щодо впливу різних доз радіонуклідного опромінення на структуру колагенових волокон, біомеханічні та пружно-міцносні властивості тканинномодифікованого матриксу. А також проведено оцінку стерильності та впливу різних режимів ліофілізації на структуру колагенових волокон виготовленого матриксу.

Дисертантом було запропоновано використання медичних доз радіаційного опромінення 5, 10, 15, 20, 25, 30 кГр для забезпечення стерилізації зразків матриксу.

Показано, що дози опромінення 20 та 25 кГр призводять до порушення орієнтації і цілісності близько 30 % колагенових волокон, а доза 30 кГр –

більше 50 %, що унеможливило використання їх для стерилізації біологічної тканини. У той же час опромінення 5, 10, 15 кГр не чинять істотного впливу на структуру та орієнтацію колагенових волокон.

Попередні дані підтверджені тестуваннями пружно-міцносних властивостей модифікованого матриксу, де опромінення в 20, 25 і 30 кГр порушують поздовжню структуру та орієнтацію колагенових волокон. Дози опромінення 5, 10, 15 кГр не спричиняють порушень поздовжньої структури волокон матриксу і можуть бути застосовані для забезпечення стерильності біоімпланту.

У той же час аналіз максимальної сили на розрив у зразках перикарду із поперечною орієнтацією волокон статистично достовірно показав значне зниження даного показника при використанні дози опромінення 15 кГр і більше ($p < 0,05$).

Таким чином, згідно отриманих даних по біомеханічному тестуванні стерилізованого радіаційним опроміненням біоімпланту встановили дози опромінення 5 та 10 кГр як такі, що не спричиняють порушень його міцності.

Бактеріологічне дослідження показало, що опромінення у 5 кГр не є стерилізаційною дозою, а лише знижує мікробне навантаження. Повна стерильність виробу забезпечується опроміненням 10 кГр і вище.

Оцінку якості сублімаційної сушки за різними режимами проводили за гістологічним аналізом кількості, структури і цілісності колагенових волокон та біомеханічним тестуванням з визначенням пружно-міцносних властивостей ліофілізованого тканинномодифікованого матриксу.

Дисертантом протестовано різні режими ліофілізації (Режим 1, 2, 3), що відрізнялися за температурними режимами та тривалістю експозиції. Гістологічний аналіз кількості, структури та орієнтації колагенових волокон при дії різних режимів ліофілізації показав значну вираженість порушень при дії Режиму 3 по типу ловушка ($p < 0,05$), що передбачає збільшення температури від від 0 °C до +23 °C зі швидкістю 1 °C на 10 хвилин протягом 20 год за умови глибокого вакууму із тиском 0,09 міліБар. Зразки витримували при даній температурі впродовж всього процесу.

Таким чином, встановлено максимально оптимізованою дозою радіаційного опромінення є 10 кГр при використанні Режиму 3 сублімаційної сушки.

Розділ 5 присвячений опису розробленої технології виготовлення, стерилізації та ліофілізації тканинномодифікованого матриксу на основі перикарду ВРХ зі створенням апаратно-технологічної схеми виробництва. На основі національних та міжнародних стандартів дисертантом розроблено технічні вимоги до розробленого медичного виробу, зокрема інструкцію щодо

проведення контрольних досліджень якості децелюляризації, ліофілізації та стерилізації.

У Розділі 6 проведено обґрунтування параметрів стандартизації виготовлення біоімпланту на основі перикарду ВРХ та визначено основні методи контролю його якості.

Завершується дисертація 7 висновками. У висновках чітко узагальнено матеріали, які отримані автором згідно з проведеним дисертаційним дослідженням.

Обґрунтованим також є і короткі резюме в кінці кожного розділу.

Дисертаційна робота оформлена відповідно до вимог наказу МОН України від 12 січня 2017 р. № 40 «Про затвердження вимог до оформлення дисертації».

Оприлюднення результатів дисертаційної роботи

Наукові результати дисертації висвітлені у 11 наукових публікаціях здобувача, серед яких: 3 статті у наукових виданнях, включених на дату опублікування до переліку наукових фахових видань України; 3 статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus, з яких 0 статей у виданнях, віднесених до першого-третього квартилів (Q1-Q3) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports; 0 патентів на винахід, що пройшли кваліфікаційну експертизу та безпосередньо стосується наукових результатів дисертації; 0 патентів України на корисну модель; 0 одноосібних монографій, що рекомендовані до друку Вченою радою КПП ім. Ігоря Сікорського та пройшли рецензування.

Також результати дисертації були апробовані на 4 наукових фахових конференціях.

Рівень наукових публікацій є досить високим. Усі результати наукових досліджень в статтях належним чином обґрунтовані та підтверджені достовірністю. Не виявлено порушень принципу академічної доброчесності. Особистий внесок здобувача в усіх публікаціях є значущим.

Таким чином, наукові результати описані в дисертаційній роботі повністю висвітлені у наукових публікаціях здобувача.

Недоліки та зауваження до дисертаційної роботи

У дисертаційній роботі Щоткіної Н.В. зустрічаються поодинокі орфографічні та несуттєві стилістичні помилки.

У ході рецензування дисертаційної роботи до автора виникло декілька зауважень, пропозицій та запитань:

1. У роботі не було відповідно детально описано методи дегідратації біоімпланту, які були використані перед проведенням порівняльної

характеристики впливу різних способів ліофілізації на тканинномодифікований матрикс на основі перикарду ВРХ. Більш докладне викладення використаних методів дегідратації дозволило б більш повно зрозуміти процес підготовки біоімпланту перед проведенням подальших експериментів та імплантації виробу у майбутньому.

2. Які перспективи використання данного біоматеріалу в умовах інфекційного ендокардиту in vivo?

Вважаю, що висловлені зауваження не є визначальними і не зменшують загальну наукову новизну та практичну значимість результатів та не впливають на позитивну оцінку дисертаційної роботи.

Висновок про дисертаційну роботу

Вважаю, що дисертаційна робота здобувача ступеня доктора філософії Щоткіної Наталії Володимирівни на тему «Біоінженерні основи отримання ліофілізованого тканинномодифікованого біосумісного матриксу для використання у кардіохірургії» виконана на високому науковому рівні, не порушує принципів академічної доброчесності та є закінченим науковим дослідженням, сукупність теоретичних та практичних результатів якого розв'язує наукове завдання, що має істотне значення для галузі знань 16 – Хімічна та біоінженерія. Дисертаційна робота за актуальністю, практичною цінністю та науковою новизною повністю відповідає вимогам чинного законодавства України, що передбачені в п.6-9 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44.

Здобувач Щоткіна Наталія Володимирівна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 16 – Хімічна та біоінженерія за спеціальністю 163 – Біомедична інженерія.

Офіційний опонент:

Завідувач відділення хірургічного
лікування інфекційного ендокардиту
Національного Інституту серцево-судинної
хірургії імені М. М. Амосова
НАМН України
д.м.н., с.н.с.

Олексій КРИКУНОВ

Підпис: О. Крикунов
Сергій 20.23 року
Нат. Вікторівна упр. передмова