

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической
химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук
(ГНЦ ИБХ РАН), по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 5 июня 2024 г. № 14

О присуждении **Толстой Татьяне Викторовне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Получение и исследование в модели *in vitro* скаффолдов на основе биodeградируемых полимеров для регенеративной медицины» по специальности 1.5.6. - Биотехнология принята к защите 3 апреля 2024 г. (протокол заседания № 9) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе ГНЦ ИБХ РАН (адрес: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10), и действующим на основании Приказов Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г. и №561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Толстова Татьяна Викторовна, 20 декабря 1994 года рождения. В 2018 году соискатель окончила с отличием магистратуру Факультета промышленной биотехнологии и биоинженерии Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева по специальности 19.04.01 – Биотехнология. В 2022 году окончила аспирантуру ГНЦ ИБХ РАН по направлению подготовки «Биотехнология». В настоящий момент работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории прецизионных биосистем Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича». Диссертация выполнена в лаборатории биомедицинских материалов ГНЦ ИБХ РАН.

Научный руководитель – доктор химических наук **Марквичева Елена Арнольдовна**, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории биомедицинских материалов ГНЦ ИБХ РАН.

Официальные оппоненты:

Горин Дмитрий Александрович, доктор химических наук, профессор центра фотоники и фотонных технологий автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий» и **Ефименко Анастасия Юрьевна**, кандидат медицинских наук, зав. лабораторией репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра, доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский

государственный университет имени М.В. Ломоносова» дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, г. Москва, в своем *положительном* отзыве, подписанном Варламовым Валерием Петровичем, доктором химических наук, профессором, главным научным сотрудником, заведующим лабораторией инженерии биополимеров Института биоинженерии им. академика К.Г. Скрыбина и утвержденном директором Федерального государственного учреждения «Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», доктором биологических наук Федоровым Алексеем Николаевичем указала, что диссертация Толстовой Татьяны Викторовны полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. №335; 02.08.2016 г. №748; 29.05.2017 г. №650; 20.03.2021 г. №426; 11.09.2021 г. №1539; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101), а автор диссертации Толстова Т.В., несомненно, достойна присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Соискатель имеет 18 опубликованных работ, в том числе 4 работы по теме диссертации общим объемом 4 печатных листа, опубликованных в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы Scopus и Web of Science). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме, в которые Толстова Т.В. внесла основной либо существенный вклад:

1. Sazhnev, N. A., Drozdova, M. G., Rodionov, I. A., Kil'deeva, N. R., **Balabanova, T. V. (Tolstova T.V.)**, Markvicheva, E. A., Lozinsky, V. I. Preparation of chitosan cryostructures with controlled porous morphology and their use as 3D-scaffolds for the cultivation of animal cells //Applied Biochemistry and Microbiology. – 2018. – Т. 54. – №. 5. – p. 459-467. IF 1.02 Q3 (WoS) (<https://doi.org/10.1134/S0003683818050162>).

2. **Tolstova T.**, Drozdova M., Popyrina T., Matveeva D., Demina T., Akopova T., Andreeva E., Markvicheva, E. Preparation and In Vitro Evaluation of Chitosan-g-Oligolactide Based Films and Macroporous Hydrogels for Tissue Engineering //Polymers. – 2023. – Т. 15. – №. 4. – С. 907. IF 5.0 Q1 (WoS, Scopus) (<https://doi.org/10.3390/polym15040907>).

3. Drozdova M., Vodyakova M., **Tolstova T.**, Chernogortseva M., Sazhnev N., Demina T., Aksenova N., Timashev P., Kildeeva N., Markvicheva E. Composite Hydrogels Based on Cross-Linked Chitosan and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid for Tissue Engineering //Polymers. – 2023.–Т. 15.– №. 10. – С. 2371. IF 5.0 Q1 (WoS, Scopus) (<https://doi.org/10.3390/polym15102371>).

4. **Tolstova T.**, Dotsenko E., Kozhin P., Novikova S., Zgoda V., Rusanov A., Luzgina N. The effect of TLR3 priming conditions on MSC immunosuppressive properties // Stem Cell Research & Therapy. – 2023.– Т. 14. – №. 1. – С. 344. IF 8.0 Q1 (WoS, Scopus) (<https://doi.org/10.1186/s13287-023-03579-y>).

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.х.н. **Горина Дмитрия Александровича**. Отзыв *положительный*, содержит следующие вопросы и замечания:

1. Стр. 36, "Добавление хитозана значительно улучшило как удлинение, так и прочность на растяжение, при этом модуль Юнга увеличился с 57.38 ± 13.21 МПа до 78.67 ± 14.15 МПа." Излишнее количество значащих цифр, если брать во внимание значения абсолютной погрешности. Корректные записи средних значений модулей Юнга с учетом абсолютной погрешности 57 ± 13 и 78 ± 14 МПа. Аналогичное замечание - Стр.51, "жесткость гидрогелей от $25,75 \pm 1,21$ до $117,82 \pm 9,83$ кПа". Излишнее количество значащих цифр, если брать во внимание значения абсолютной погрешности. Корректные записи средних значений жесткости гидрогеля с учетом абсолютной погрешности 26 ± 1 и 118 ± 10 кПа. Аналогичное замечание - Стр. 77. "Равновесная набухаемость макропористого гидрогеля Хит в среде DMEM составила $27,8 \pm 1,8$ мл/г после 24 ч инкубации (Рисунок 5). В случае образца макропористого гидрогеля Хит-LL степень набухания увеличилась до $31,1 \pm 3,5$ мл/г." Корректные записи средних значений набухаемости гидрогелей с учетом абсолютной погрешности 28 ± 2 и 31 ± 4 мл/г.
2. Стр.65. Формула 2 для расчета набухаемости, было бы логично рассчитывать эту величину в процентах.
3. В работе исследуются механические свойства матриц, было бы полезно уделить этому вопросу большее внимание в литературном обзоре и сравнить экспериментальные результаты с уже опубликованными данными для подобных систем.
4. Стр. 82. " $38,0 \pm 1,0$ Мпа и $3,7 \pm 0,9$ %, соответственно". Единица измерения - МПа.

Отзыв официального оппонента к.мед.н. **Ефименко Анастасии Юрьевны**. Отзыв *положительный*, содержит следующие вопросы и замечания:

1. В диссертационной работе прекрасно подготовлен обзор литературы, посвященный различным проблемам тканевой инженерии и обосновывающий необходимость разработки новых биоматериалов для этой области. Однако необходимо отметить, что при описании клеточных компонентов тканеинженерных конструкций упомянуты преимущественно стволовые клетки, в то время как достаточно много примеров использования специализированных клеток для этой цели. В подразделе про клеточную терапию и стволовые клетки почему-то описаны плюрипотентные стволовые клетки и мезенхимные стволовые клетки, а про остальные типы мультипотентных стволовых клеток, к которым относятся и МСК, в этом разделе нет ни слова. Кроме того, нарушена общая логика изложения в главе 1.1.4. «Триада тканевой инженерии»: сначала диссертант

пишет про стволовые клетки как источник материала для тканевой инженерии, потом про бесклеточные подходы, а затем снова про постнатальные стволовые клетки («взрослые стволовые клетки»). Обоснование такой последовательности изложения материала не очень понятно.

2. В разделе 3.1.1. результатов указано, что «во всех исследованных образцах гидрогелей размер пор являлся оптимальным для роста и пролиферации клеток». Насколько корректно и доказательно такое утверждение для всех типов клеток?

3. Хотелось бы уточнить, как диссертант может объяснить установленные различия в морфологии и адгезии клеток мышинных фибробластов и МСК к плёнкам и поверхности пор гидрогелей биоматериалов на основе хитозана и его сополимеров и как это можно связать с образованием сфероидов в экспериментах по остеогенной дифференцировке МСК? Так, в культуре линейных мышинных клеток, культивируемых на плёнках из хитозана, наблюдали много прикрепленных клеток сферической формы, в то время как для гидрогелей такие клетки наблюдали преимущественно для сополимеров хитозана с олиголактидами. Схожая картина наблюдалась для МСК. В диссертации в обсуждении этих результатов упомянуты общие рассуждения о разнице в гидрофильно-гидрофобном балансе сополимеров хитозана с L,D-олиголактидом, однако нет предположений о конкретных механизмах выявленных различий в клеточном поведении.

4. В продолжение предыдущего вопроса хотелось бы более подробного обсуждения возможных механизмов усиления пролиферативного потенциала стромальных клеток в образцах гидрогелей на основе хитозана.

5. На рис.5 (автореферат) и 8 (диссертация) приведен график по уровню жизнеспособных клеток в %, на котором представлен один из результатов, превышающий 100%, что противоречит формальной логике. Ниже из описания результатов можно понять, что эти данные относительно контроля, что объясняет такое несоответствие, однако, тогда это должно быть отражено на рисунке и в подрисуночной подписи.

6. На стр.23 автореферата и стр.108 диссертации указано, что «матрицы на основе Хит и Хит-LL поддерживали, а образцы Хит-LD даже усиливали адипогенную дифференцировку МСК в модели *in vitro*», хотя это не соответствует представленным экспериментальным данным (матрицы Хит-LL обладали преимуществом в отношении стимуляции адипогенной дифференцировки МСК). Вероятно, это опечатка.

7. В диссертации отсутствует раздел описания методов статистической обработки и анализа полученных данных, хотя в результатах приведены данные по сравнению количественных показателей между экспериментальными образцами биоматериалов. Кроме того, ни в разделе «Материалы и методы», ни в подрисуночных подписях не указано, какое количество образцов было исследовано в каждом эксперименте, какое количество технических повторов выполнено, что затрудняет восприятие.

Отзыв ведущей организации. Отзыв *положительный*, содержит следующие вопросы:

1. В работе продемонстрированы результаты исследования структуры с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Не совсем понятно, почему автором был выбран данный метод вместо сканирующей электронной микроскопии, которую использует большинство других исследователей.
2. Почему в качестве фермента для исследования биodeградации хитозана и матриц на его основе был выбран лизоцим? Почему выбрана именно такая концентрация (2 мг/мл)?
3. Чем обоснован выбор хитозана с молекулярной массой 80 кДа для получения сополимеров с олиголактидами? Использовали ли хитозан с другой молекулярной массой?

Отзыв на автореферат д.х.н., профессора, заведующей кафедрой химической энзимологии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», **Клячко Натальи Львовны**. Отзыв *положительный*, замечаний не содержит.

Отзыв на автореферат д.б.н., доцента, ведущего научного сотрудника лаборатории клеточной физиологии ФГБОУ ГНЦ РФ Института медико-биологических проблем Российской академии наук, **Андреевой Елены Ромуальдовны**. Отзыв *положительный*, замечаний не содержит.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, близких к тематике работы: разработка и исследование различных биоматериалов для применения в биомедицине, в том числе на основе природных полисахаридов, а также в области клеточной биологии, что подтверждается количеством и высоким уровнем их публикаций в ведущих научных международных журналах. Оппоненты и представители ведущей организации обладают большим опытом исследовательской и экспертной работы, а также высокой квалификацией, которые позволяют им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований впервые были охарактеризованы макропористые гидрогели на основе хитозана и его сополимеров с олиго(L,L-/L,D-лактидами) с точки зрения их физико-химических свойств (структура, средний размер пор и распределение пор по размерам, степень набухания, деградация в модели *in vitro*, механические свойства). Впервые исследована цитотоксичность гидрогелей с использованием линии мышечных фибробластов (L929), а также их иммуногенность по активации клеток линии моноцитов человека (THP-1) в моделях *in vitro*. Впервые показано, что гидрофильно-гидрофобный баланс и кинетика биodeградации гидрогелей на основе сополимеров хитозана с олиголактидами зависят от типа привитого олиголактида. Продемонстрировано, что все

матрикс поддерживали прикрепление, рост и пролиферацию различных типов животных клеток (мышинные фибробласты L929, мезенхимальные стромальные клетки (МСК), выделенные из жировой ткани человека). Впервые установлено, что пленки на основе сополимеров хитозана с олиголактидами могут влиять на остео- и/или адипогенный потенциал МСК, причем усиление этого потенциала зависит от типа привитого олиголактида.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что полученные в работе результаты позволяют расширить знания о влиянии структуры и физико-химических свойств композитных матриксов (пленок и макропористых гидрогелей) на поведение, а также пролиферацию и/или дифференцировку культивируемых на/в них клеток. Установлено, что варьирование полимерного состава пленок позволяет направлять дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток человека, в частности усиливать остео- и/или адипогенез.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики заключается в том, что на основе матриксов из сополимеров хитозана с олиголактидами могут быть созданы новые эффективные скаффолды для регенеративной медицины, в частности для усиления дифференцировочного потенциала МСК при регенерации костной и/или жировой тканей.

Достоверность полученных результатов определяется использованием в работе современных общепринятых физико-химических, молекулярно-биологических и статистических методов. Полученные в работе результаты не противоречат результатами современных исследований в данной области.

Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных по теме диссертации, планировании и выполнении всей экспериментальной части работы, а также обработке и анализе полученных результатов. Матрикс для исследования были предоставлены Институтом синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН. Автор принимал участие в подготовке и написании статей, а также представлении результатов исследования на российских и международных конференциях.

Диссертационный совет 24.1.037.01 заключил, что диссертационная работа Толстовой Татьяны Викторовны является законченной научно-квалифицированной работой, в результате которой были получены и охарактеризованы важные для пролиферации и дифференцировки клеток физико-химические и биологические свойства скаффолдов на основе сополимеров хитозана с олиголактидами, которая вносит существенный вклад в развитие биотехнологии.

Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты и по своему содержанию соответствует специальности 1.5.6. – Биотехнология. Таким образом, диссертационная работа Толстовой Татьяны Викторовны «Получение и исследование в модели *in vitro* скаффолдов на основе биodeградируемых полимеров для регенеративной медицины», представленная на соискание ученой степени кандидата

химических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. №1539; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101.

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие вопросы:

1. Вопрос касается последней части вывода о дифференцировке МСК. Скажите пожалуйста, есть ли опасность их перерождения в онкогенные клетки при использовании в трансплантации?
2. Среди публикаций в списке Ваших работ по теме диссертации, вопрос к последней. Вы не могли бы прокомментировать эту работу и как она связана с тем, что Вы рассказывали?
3. Регенеративная медицина очень конкурентная область. На основании Ваших выводов не совсем понятно, с кем же Вы соревнуетесь, и кто сейчас лидер по этой части. Вы впереди или догоняете? Как Вы смотрите на мировом поле в этой области?

Соискатель Толстова Т.В. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы:

1. Да, действительно, прогресс тканевой инженерии с использованием стволовых клеток ограничен как их потенциальной иммуногенностью, так и вероятностью перерождения. Во избежание этих проблем, на сегодняшний день также рассматриваются стратегии использования матриц с кондиционной средой от МСК, например, нагруженных везикулами.
2. В этой работе первые опубликованы результаты по получению и исследованию фенотипа МСК, оценке их регенеративного потенциала и иммуносупрессивных свойств. На основании результатов этой работы были сформулированы задачи по исследованию МСК как клеточного компонента в тканеинженерных конструкциях на основе хитозана. Результаты в диссертации и, в частности, рисунок 3 на слайде 6 — это та часть, которая опубликована в данной статье.
3. Да, действительно область биополимеров и клеточные технологии развиваются очень интенсивно. Количество публикаций, в которых получают и исследуют матрицы на основе хитозана, увеличивается с каждым годом, что, как мне кажется, подтверждает актуальность и нашей работы. Хитозан активно применяется в качестве компонента матриц, несмотря на недостатки, и методы получения на его основе композитных материалов активно исследуются. Поэтому я считаю, что мы действительно занимаемся решением важной проблемы и, в этом вопросе, находимся на одном уровне с зарубежными коллегами.

