

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **СОЧИЛИНОЙ АНАСТАСИИ ВЛАДИМИРОВНЫ** «**Материалы на основе хитозана и модифицированной гиалуроновой кислоты для получения структурно-организованных скаффолдов в тканевой инженерии**», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология

Тканевая инженерия приобретает всё большее значение в медицинской отрасли как одно из направлений регенеративной медицины. Создание искусственных тканей для замены повреждённых тканей и органов пациента возможно двумя способами: децеллюляризация (отмывка от клеток) донорских органов с последующим заселением получаемого каркаса собственными клетками пациента или формирование аналогичного каркаса (также известного, как скаффолд) с нуля на основе специальных биосовместимых материалов. Во втором подходе отпадает необходимость в использовании донорских органов, что даёт ему несомненные преимущества: снижение риска отторжения и передачи заболевания, а также преодолевает самую главную проблему донорства – дефицит подходящих органов для пересадки. Несмотря на перечисленные достоинства, более широкое использование тканевой инженерии пока что затруднено из-за многочисленных проблем, связанных с получением скаффолдов, подходящих для имплантации. Помимо хорошей биосовместимости и желательной биodeградации, скаффолды также должны обладать прочной высокопористой структурой с хорошей адгезией к клеткам. Кроме того, для наилучшей совместимости и регенерации механические свойства скаффолдов должны имитировать механические свойства замещаемых тканей. Создание скаффолдов, удовлетворяющих всем этим требованиям, является ключевой задачей тканевой инженерии. Решение именно этой актуальной задачи и легло в основу диссертационной работы Сочилиной А.В. - получение скаффолдов с заданными физико-химическими свойствами и требуемой архитектурой на основе природных полисахаридов хитозана и гиалуроновой кислоты. Представленные полисахариды были выбраны в качестве основных материалов для получения скаффолдов благодаря их природному происхождению, хорошей биосовместимости и биологической активности.

Диссертационная работа изложена на 132 страницах, содержит 4 таблицы, 17 схем и 39 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающей 178 ссылок.

В первой главе, «**Обзор литературы**», автор рассматривает основные известные биосовместимые полимеры и способы получения гидрогелевых скаффолдов на основе приведённых соединений, подробно останавливаясь на полимерах природного происхождения, как наиболее перспективных из них. Кроме того, приведены основные способы формирования гидрогелей: реакции сшивки на основе ковалентных и нековалентных взаимодействий. При описании ковалентных реакций сшивки особое внимание уделено фотоиндуцируемым реакциям, активируемым светом из УФ-, видимого и ИК диапазона. Такие способы формирования гидрогелей представлены и в главе «**Результаты и обсуждение**» – для получения скаффолдов на основе хитозана были использованы нековалентные реакции сшивки, а для гиалуроновой кислоты – ковалентные, индуцированные светом.

В главе «**Материалы и методы**» описаны методы получения гидрогелевых скаффолдов и их характеристики, а также протоколы *in vitro* и *in vivo* исследований полученных скаффолдов. Стоит отметить не только разнообразие использованных методов (как традиционных, так и современных), но и наличие методик, разработанных автором: количественное определение степени замещения у гиалуроновой кислоты, модифицированной глицидилметакрилатом, посредством реакции с перманганатом калия; новый способ получения трубчатых скаффолдов; а также новые методы формирования терможелируемых гелей и канальных гелей из хитозана.

Глава «**Результаты и их обсуждение**» разделена на три подглавы, первые две из которых посвящены хитозановым скаффолдам, а последняя – скаффолдам на основе модифицированной гиалуроновой кислоты. В подглаве 3.1 описан новый способ получения гелей методом термоиндуцированного разделения фаз в водно-спиртовых растворах хитозана. Уникальной особенностью разработанного автором метода является проведение желирования в незамерзающих условиях,

исключающих образование кристаллов льда, что в свою очередь позволяет получать гели с гомогенной структурой, состоящей из наночибрилл. Кроме того, такие гели отличаются прозрачностью и высоким модулем Юнга. Автором была продемонстрирована возможность получения описанным методом скаффолдов самых различных форм как молдингом, так и 3D-печатью, а также отличная биосовместимость гелей с тканями живого организма.

В подглаве 3.2 описан также новый метод получения хитозановых скаффолдов с системой однонаправленных микроканалов. Как и в случае наночибриллярных гелей, формирование канальных гидрогелей происходит за счёт нековалентной сшивки; при этом разделение фаз с формированием канальной структуры возникает в результате фронтального осаждения щёлочью растворов хитозана с поливиниловым спиртом. Такие скаффолды с микроканальной структурой возможно использовать для регенерации разрывов нервной ткани, направленный рост которой обеспечивается за счёт параллельно ориентированных каналов, что было показано автором в *in vitro* эксперименте на примере культуры клеток глиомы С6.

Подглава 3.3 посвящена формированию скаффолдов различных структур и функций посредством индуцированной светом реакции ковалентной сшивки гиалуроновой кислоты. Для проведения такого типа сшивки гиалуроновую кислоту модифицировали глицидилметакрилатом для введения винильных групп. Для контроля степени замещения звеньев полимера группами глицидилметакрилата был разработан количественный экспресс-метод на основе реакции перманганата калия с непредельными соединениями. Автор продемонстрировал влияние степени замещения на свойства растворов и гидрогелей из модифицированной гиалуроновой кислоты, что позволяет использовать этот параметр для тонкой настройки свойств скаффолдов. Для формирования скаффолдов методами экструзионной 3D-печати на основе модифицированной гиалуроновой кислоты изготавливали специальные фотоотверждаемые композиции, содержащие фотоинициаторы, отвечающие за протекание реакции сшивки при различной длине волны возбуждающего излучения. В качестве фотоиницирующей системы, активируемой излучением из синего диапазона спектра (450 нм), использовали биосовместимый флавин мононуклеотид (производное витамина В2) совместно с

триэтаноламином, обладающей низкой темновой цитотоксичностью. Впервые были получены фотоотверждаемые композиции из модифицированной гиалуроновой кислоты, содержащие водорастворимое производное фталоцианина, поглощающее излучение из красного диапазона спектра (670 нм). Это излучение способно проходить сквозь ткани организма, что позволило автору провести *in situ* фотоотверждение данных композиций под кожей животного.

Достоверность, новизна и практическая значимость полученных автором диссертационной работы результатов не вызывает сомнений. Автореферат соответствует содержанию работы, а основные положения диссертации были представлены на 8 российских и международных конференциях и опубликованы в 12 статьях.

Таким образом, в целом диссертация Сочилиной А.В. производит благоприятное впечатление. Однако имеются следующие замечания по диссертационной работе:

- 1) При исследовании структуры алкогелей на основе водно-спиртовых растворов хитозана методом сканирующей электронной микроскопии применялась предшествующая измерениям лиофилизация. Хорошо, что это отмечено в диссертации. Но также следует обсудить, насколько процесс лиофилизации, а точнее скорость заморозки образцов, влияет на размер пор геля, их распределение по размерам и т.д.
- 2) Исследование физико-механических свойств проводилось при комнатной температуре. В то время как применение материалов планируется при температуре тела человека. Прочностные свойства разработанных в работе материалов будут зависеть от температуры. Следует провести дополнительные исследования температуре 37°C и желательно в фосфатном буфере.
- 3) При исследовании реологических свойств раствором и композиций модифицированной гиалуроновой кислоты необходимо исследовать не только кинематическую вязкость, но и получить кривые течения – это позволит подобрать правильные параметры трехмерной печати для этой системы.

