

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный Научный Центр Российской Федерации
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН)

СТЕНОГРАММА

Заседание диссертационного совета 24.1.037.01

5 июня 2024 г.

Защита диссертации
на соискание ученой степени кандидата химических наук

Толстой Татьяны Викторовны

По теме: «**Получение и исследование в модели *in vitro* скаффолдов на основе биodeградируемых полимеров для регенеративной медицины**»

Специальность – 1.5.6. Биотехнология

Москва – 2024 г

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 5 июня 2024 года.

Председатель
диссертационного совета акад., д.х.н. Анатолий Иванович Мирошников

Ученый секретарь
диссертационного совета д.ф.-м.н. Владимир Александрович Олейников

Из 30 членов совета присутствует 22 человека, из них докторов по профилю диссертации – 7.

- | | | |
|----------------------------|-----------------------------------|---------|
| 1. Академик РАН, д.х.н. | Мирошников Анатолий Иванович | (1.5.6) |
| 2. Д.физ.-мат.н. | Олейников Владимир Александрович | (1.5.6) |
| 3. Д.б.н. | Ажикина Татьяна Леодоровна | (1.5.3) |
| 4. Д.х.н. | Безуглов Владимир Виленович | (1.4.9) |
| 5. Д.х.н. | Белогуров Алексей Анатольевич | (1.5.3) |
| 6. Академик РАН, д.х.н. | Габибов Александр Габибович | (1.5.6) |
| 7. Д.х.н. | Генералова Алла Николаевна | (1.5.6) |
| 8. Академик РАН, д.б.н. | Деев Сергей Михайлович | (1.5.3) |
| 9. Д.х.н. | Дзантиев Борис Борисович | (1.4.9) |
| 10. Д.б.н. | Долгих Дмитрий Александрович | (1.5.3) |
| 11. Академик РАН, д.х.н. | Донцова Ольга Анатольевна | (1.5.3) |
| 12. Член-корр. РАН, д.б.н. | Завриев Сергей Кириакович | (1.5.6) |
| 13. Д.б.н. | Зарайский Андрей Георгиевич | (1.5.3) |
| 14. Д.х.н. | Зубов Виталий Павлович | (1.5.6) |
| 15. Д.б.н. | Лебедев Юрий Борисович | (1.5.3) |
| 16. Член-корр. РАН, д.х.н. | Мирошников Константин Анатольевич | (1.5.6) |
| 17. Д.х.н. | Овчинникова Татьяна Владимировна | (1.4.9) |
| 18. Д.б.н. | Сапожников Александр Михайлович | (1.5.3) |
| 19. Д.х.н. | Смирнов Иван Витальевич | (1.4.9) |
| 20. Д.х.н. | Уткин Юрий Николаевич | (1.4.9) |
| 21. Член-корр. РАН, д.х.н. | Цетлин Виктор Ионович | (1.4.9) |
| 22. Д.х.н. | Шахпаронов Михаил Иванович | (1.4.9) |

Мирошников А.И.: Защита - Толстова Татьяна Викторовна. "Получение и исследование модели *in vitro* скаффолдов на основе биodeградируемых полимеров для регенеративной медицины". Специальность - биотехнология. Научный руководитель Елена Арнольдовна Марквичева. Официальный оппонент Горин Дмитрий Александрович, доктор химических наук, профессор Центра фотоники и фотонных технологий из Сколковского института науки и технологий. Ефименко Анастасия Юрьевна, кандидат медицинских наук, зав. лабораторией репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ. И ведущая организация - это Федеральный исследовательский центр Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук. Пожалуйста, Владимир Александрович.

Олейников В.А.: Да, значит данные. *(зачитывает информацию о соискателе и документах, содержащихся в личном деле соискателя.)* Толстова Татьяна Викторовна, гражданка Российской Федерации, окончила в 2018 году с отличием магистратуру факультета промышленной биотехнологии и биоинженерии Российского химико-технологического университета имени Менделеева по специальности Биотехнология. Аспирантуру нашего института окончила в 2022 году по направлению подготовки Биотехнология. С 2021 по настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории прецизионных биосистем Федерального государственного бюджетного научного учреждения Научно-исследовательского институт биомедицинской химии имени Ореховича. Кандидатский экзамен по специальности биотехнология сдан с оценкой отлично. Работа выполнена в лаборатории биомедицинских материалов нашего института. Научный руководитель диссертационной работы доктор химических наук Марквичева Елена Арнольдовна, руководитель лаборатории биомедицинских материалов. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах. Объявления о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК 4 апреля 2024 года, то есть вовремя, и все необходимые документы в деле имеются.

Мирошников А.И.: Вопросы к учёному секретарю? Нет? Нет. Ну так что? Давайте. Татьяна Викторовна, излагайте.

Олейников В.А.: На сцену, пожалуйста.

Толстова Т.В.: *(излагает основные положения диссертационной работы)*

Мирошников А.И.: Спасибо. Так, вопросы? Пожалуйста.

Деев С.М.: Спасибо большое за очень интересную работу. Мой вопрос касается той части работы Вашей и Вашего последнего вывода о дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток. Очень хорошие у Вас результаты. Скажите, пожалуйста, есть ли опасность при использовании таких клеток при дифференцировке в тератогенный потенциал? Могут ли образовываться онкогенные клетки?

Толстова Т.В.: Благодарю за вопрос. Да, конечно, чисто теоретически это пока и ограничивает тканевую инженерию и использование стволовых клеток, потому что возможен, кроме того, еще и иммунный какой-то ответ на стволовые клетки, потому что их популяция очень неоднородна. Но тем не менее, мы все равно работаем над этим, все равно исследуем и матриксы, и может быть потом матриксы хотя бы с кондиционной

средой от стволовых клеток. Но теоретически, к сожалению, пока что, такая вероятность есть.

Мирошников А.И.: Еще вопросы?

Белогуров А.А.: Спасибо вам за очень интересный доклад. У меня такой вопрос, может быть, более общий. Вот у вас такая работа замечательная есть в списке, и вы не могли бы рассказать, ну да, вот она последняя, вы не могли бы прокомментировать, скажем так, эту работу и как она связана с тем, что вы рассказывали?

Толстова Т.В.: В этой работе я впервые выделяю самостоятельно стволовые клетки, начинаю их изучение, узнаю о том, что надо подтверждать сначала их иммунофенотип, потом, что у них есть и регенеративный потенциал, и есть какие-то иммуносупрессивные свойства. Да, в этой работе больше интерес направлен уже на оценку иммуносупрессивных свойств стволовых клеток в целом, но эта часть работы была мне просто необходима, чтобы потом понимать, что с этими клетками я могу сделать, используя матриксы. Часть результатов я даю внизу ссылки, это непосредственно сами клетки и подтверждение иммунофенотипа, это результаты, опубликованные в той статье.

Мирошников А.И.: Еще вопросы? Борис Борисович, пожалуйста.

Дзантиев Б.Б.: Спасибо, поздравляю, хорошая работа. Но регенеративная медицина сейчас очень конкурентная область. Я из ваших выводов не очень понял, вот с кем вы соревнуетесь? Кто сейчас лидер по этой части? Вы впереди, вы догоняете? Вот как сейчас вы смотрите на таком вот мировом поле в этой области? Потому что очень много работ сейчас.

Толстова Т.В.: Благодарю за вопрос. Да, действительно, сейчас очень интенсивно развиваются различные биополимеры и клеточные технологии. Но, тем не менее, количество публикаций с матриксами на основе хитозана действительно увеличивается с каждым годом, как и его использование. Поэтому, в моем понимании, мы находимся у истоков прогресса. То есть, да, хитозан активно используется, несмотря на его недостатки. Получение композитных матриксов на его основе — это такое сейчас перспективное направление, поэтому, как мне кажется, что мы вот, не то, чтобы там догоняем или прямо на передовой, но мы вот в центре находимся. В первую десятку, к сожалению, не входим. Я думаю, что практическое применение сейчас пока что ограничено матриксами без клеток. Это действительно так, потому что вызывает меньше вопросов, но мы стремимся к тому, что и клетки, культивируемые на матриксах, тоже когда-то получится имплантировать.

Мирошников А.И.: Еще вопросы? Вопросов нет, спасибо, посидите. Так, Елена Арнольдовна.

Марквичева Е.А., научный руководитель: Здравствуйте, всем добрый день. Сегодня я хочу сказать несколько слов о своей очередной аспирантке, которая только недавно закончила аспирантуру. И, собственно, она открывает вторую десятку диссертаций, которыми мне посчастливилось поруководить. И я бы сказала, очень удачно открывает. Ну и когда я думала на тему, что же сказать про Таню, я поняла, чем она отличается от всех моих других ребят, какие у неё качества и как они помогают ей вообще в работе.

Дело в том, что Таня у нас вообще спортсменка, лыжница. И поэтому такая большая целеустремлённость, железный характер, абсолютно такая самоорганизация. до такой степени, что она организует не только себя, но организует всех, кто есть вокруг неё. Она видит цель, она к ней идёт. Если Таня пишет: "Я тут написала, посмотрите, пожалуйста, если будет возможность" Перевести на русский это можно как «посмотрите, пожалуйста, сегодня», а уж в крайнем случае «завтра». И пришлите, поскольку у меня уже есть дальше план работы». Если Вы не укладываетесь в дедлайн, то Таня обязательно напомнит. Таня сделала, если серьёзно, очень большой прогресс с того момента, как она пришла, и мы начали её учить. То, что сегодня она демонстрирует, особенно в последней части своей работы, про стволовые клетки, я бы сказала, это целиком её заслуга, потому что мы её уже просто не догоняем. Она всё в этой работе сделала абсолютно сама, она их выделила, сделала ПЦР, она всё посмотрела, иммуноферментный анализ сделала, научилась всё это делать. И, в общем, поставила меня перед фактом, что я должна одного из оппонентов, видимо, приглашать специалиста по стволовым клеткам. И сегодня такой оппонент у нас есть. Это Анастасия Юрьевна. Она уже защитила докторскую месяц назад, хотя она там в сведениях еще кандидат. Она как раз заведует лабораторией в Институте регенеративной медицины в МГУ. Да, совершенно, верно. И ещё, пользуясь случаем, про Таню, мне кажется, я уже всё рассказала. Она реально выросла. Таня пишет сама статьи. Таня делает всё руками. Таня руководит студентами. Она выступает на конгрессах. Последнее её выступление было на Национальном конгрессе, организованном тем же Ткачуком. Вот в этом году будет ещё один в ноябре. Поэтому её квалификация, мне кажется, несмотря на то что она достаточно быстро подошла к этому рубежу, она точно абсолютно уже соответствует квалификации кандидата наук. Но ещё, пользуясь случаем, я заодно хочу поблагодарить не только Анастасию Юрьевну, но ещё Дмитрия Александровича, оппонента первого, который будет выступать, видимо, сразу после меня, за то, что он согласился нам помочь и посмотрел эту работу. Спасибо большое.

Олейников В.А.: Елена Арнольдовна, вы знаете, я испугался. Если такая у вас диссертация, что она там, построит институт Ореховича в два счета, нет?

Марквичева Е.А., научный руководитель: Ну, в общем, да, она этим отличается. Это очень хорошее качество, ей-богу, очень хорошее качество.

Олейников В.А.: А почему не оставили у нас?

Марквичева Е.А., научный руководитель: Потому что у нас нет для неё даже полставки в данный момент. Мы с удовольствием её взяли бы даже на четверть, мы продолжаем с ней работать.

Олейников В.А.: Нет полставки или нет возможности работать в этой области?

Марквичева Е.А., научный руководитель: Нет, есть возможность работать в этой области. У нас есть сейчас совместный грант с РФФ, с МГУ, в котором Таня...

Олейников В.А.: С Качуковым?

Марквичева Е.А., научный руководитель: Нет, с Клячко Натальей Львовной, в котором Таня один из основных главных исполнителей. Она продолжает с нами работать.

Мирошников А.И.: Понятно. Спасибо. Так, Владимир Александрович, пожалуйста.

Олейников В.А.: Я вмещаюсь между оппонентом и руководителем. Работа выполнялась в нашем институте, поэтому заключение от нашего института. *(Зачитывает положительное заключение организации, где выполнялась диссертация).* Название вы слышали. Выполнялась в лаборатории биомедицинских материалов руководитель которой только что выступала, Елена Арнольдовна. В заключении: рассмотрено на заседании отдела нашего, биоматериалов и бионанотехнологий. Ну и значит вывод по рассмотрению был, что работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. В диссертации получены и исследованы новые биodeградируемые матриксы, в частности двумерные пленки и трёхмерные макропористые гидрогели на основе сополимеров хитозана. Выполнен большой объём работ с использованием самых современных физико-химических, молекулярно-биологических методов исследований. В работе впервые показано, что состав полимера позволяет менять физико-химические свойства матриксов, что в свою очередь оказывает влияние на направление дифференцировки стволовых клеток. Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне. Представлены результаты в четырех статьях, ну и общее заключение нашего заседания отдела биоматериалов и бионанотехнологий, что работа рекомендуется к защите. Единогласное голосование подписано заведующим отделом и утверждено директором нашего института, академиком Александром Габировичем Габировым. Это заключение.

Теперь ведущая организация. Ведущая организация – это Федеральный исследовательский центр Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук. *(Зачитывает положительный отзыв ведущей организации).* Отзыв ведущей организации положительный полностью, но опять же подчеркивается актуальность темы диссертации, говорится о том, что хитозан – это перспективный биополимер, следует особо отметить биосовместимость и биodeградацию. Однако область применения матриксов на основе хитозана ограничена достаточно низкими механической прочностью и высокой скоростью биodeградации, и получение композитных биоматериалов является актуальной задачей для преодоления недостатков однокомпонентных матриксов-скаффолдов. Диссертация изложена на 134 страницах, включает 18 рисунков. Обзор литературы, цитируемый, включает 222 источника. Литобзор написан тщательно, всесторонне рассмотрены некоторые физико-химические свойства, а также преимущества и недостатки различных природных и синтетических полимеров, применяемых для получения полимерных скаффолдов. Надо отметить, что обзор литературы написан логично, грамотно и оставляет самое приятное впечатление. Материалы и методы: в полной мере представлены, все используемые в работе реактивы протоколы исследований. Результаты и обсуждение: подробно и логично описаны результаты работы. Но я не буду здесь повторять, зачитывать, поскольку мы это очень хорошо слышали. Но вот в заключении, все результаты хорошо проанализированы, грамотно интерпретированы и обсуждены с привлечением аналогичных результатов, описанных в литературе. Заключение. В главе подведены общие итоги проделанной работы. Отмечается научная новизна, теоретическая и практическая значимость этой работы. Степень обоснованности и достоверности отличается хорошей логикой с момента формулирования целей и задач до обсуждения полученных результатов и сделанных из них выводов. Повторяю, 18 печатных работ, из них 4 статьи в индексируемых журналах и в наукометрических базах данных Scopus и Web of Science. Вопросы к работе. В работе

продемонстрированы результаты исследования структуры с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Не совсем понятно, почему авторам был выбран данный метод вместо сканирующей электронной микроскопии, которую используют большинство других исследователей. Второе. Почему в качестве фермента для исследования биодegradации хитозана и матриксов на его основе был выбран лизоцим? Почему выбрана именно такая концентрация 2 мг в мл? Третье. Чем обоснован выбор хитозана с молекулярной массой 80 кДа для получения сополимеров с олиголактидами? Использовали ли хитозан с другой молекулярной массой? Ну и в заключении пишется, что перечисленные замечания не снижают научную ценность диссертации, что диссертация соответствует всем положениям ВАКа в кандидатских диссертациях, и автор диссертации, несомненно, достоин присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 - Биотехнология. Ну и соответственно отзыв рассмотрен и утверждён на заседании лаборатории инженерии биополимеров. Подписано: заведующей лабораторией доктор химических наук профессор Варламов. И отзыв утверждён директором учреждения, федерального государственного учреждения, федеральный исследовательский центр фундаментальной основы биотехнологии РАН. Это доктор биологических наук Федоров. Но были замечания. Спасибо.

Мирошников А.И.: Татьяна Викторовна, отвечайте.

Толстова Т.В.: Хотелось бы поблагодарить за замечания. Да, первый вопрос был связан с выбором метода для визуализации структуры. Данный метод был выбран нами не случайно, потому что мы хотели исследовать матриксы именно в их функциональном набухом состоянии, чего бы нам не позволила сделать сканирующая электронная микроскопия. Кроме того, именно с помощью такого метода, мы потом смогли визуализировать и живые клетки, чего бы нам тоже, к сожалению, не смогла обеспечить сканирующая электронная микроскопия. На второй вопрос, почему был выбран именно лизоцим для исследования биодegradации? Да, по литературным данным уже известны и специфические хитиназы, и не специфические ферменты, которые могут расщеплять хитозан, однако по-прежнему модельным считается лизоцим. Поэтому он нами и был выбран. И концентрация тоже на основании литературных данных, Мы посмотрели, в работах используют от 0,2 до 10 мг на мл, но поскольку концентрация в крови существенно ниже, мы всё-таки на нижнюю границу ориентировались и выбрали 2 мг на мл. И что касается выбора молекулярной массы хитозана, коллеги в Институте синтетических полимерных материалов проводили первичную оценку физико-химических свойств матриксов на основе хитозана, брали 60, 80 и 320 кДа. Были выбраны 80 кДа, в том числе потому, что высокомолекулярный хитозан не обеспечил нужную степень прививки, а физико-химические свойства хитозана на 60 кДа несколько уже отличались и поэтому остановились на 80 кДа и как оказалось не зря, такие наблюдения нам удалось потом получить при работе с клетками.

Олейников В.А.: Так, отзывы на автореферат. Отзывов поступило два. Оба абсолютно положительные и хорошие слова. Да, автореферат диссертации хорошо структурирован, полностью отражает структуру. Текст изложен логично, последовательно. Подписано заведующий кафедрой химической энзимологии химфака МГУ имени Ломоносова Клячко Наталья Львовна. Второй отзыв тоже полностью положительный. Значит, так, автор четко сформулировал цель задачи исследования, показал научную новизну. Подписано:

Андреева Елена Ромуальдовна. Это ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии Института медико-биологических проблем Российской академии наук. Спасибо.

Мирошников А.И.: Да, ну так как замечаний нет, то переходим к выступлению оппонентов. Пожалуйста, Дмитрий Александрович Горин.

Горин Д.А., оппонент: Добрый день, уважаемые коллеги. *(Излагает положительный отзыв)*. Я предоставил отзыв и хотел бы высказать неформальное отношение к данной работе. Прежде всего, она очень понятна химику, специалисту в области физической химии, в частности, своей идеологией. То есть в чём заключается идея работы в том, что мы варьируем химический состав матрикса и смотрим, как это варьирование влияет на физико-химические свойства и на функциональные свойства. А под функциональными свойствами мы понимаем, как хорошо или плохо живется на этой поверхности клеткам. И она подкупает своей простотой, но за эту простоту диссертанту пришлось попотеть. Это потребовало огромного количества экспериментов и характеристики, в том числе механических свойств данных систем. Действительно, я в своей рецензии больше обращал внимание на химические и даже на физические свойства данных матриксов. Хотел бы ещё отметить, что работа хорошо опубликована, результаты работы представлялись на международных конференциях, и те замечания, и те недостатки, которые мне удалось найти, они носят технический характер. Первое замечание связано с тем, что некоторые параметры, которые в ходе работы были определены, в том числе характеризующие механические свойства систем, были даны без учета значения абсолютной погрешности. Один из примеров только приведу. Модуль Юнга $57,38 \pm 13,21$ МПа. То есть понятно, что данное значение следовало бы записать 57 ± 13 МПа с учетом значения абсолютной погрешности. Следующая страница 65, формула 2 для расчёта набухаемости. Мне кажется, было бы логично её рассчитывать и оценивать в процентах, тем более изменение массы, матрица измеряется в процентах, можно было бы посмотреть корреляцию и так далее. Проще оценивать. Также в работе исследуются механические свойства матриксов, и мне, кажется, в литературном обзоре, который, кстати, очень высокого качества, можно было бы больше внимания уделить как раз описанию механических свойств, а также возможности варьирования механических свойств матриксов. Последнее замечание также вносит технический характер. Не совсем правильно были единицы измерения как раз механических свойств приведены. Тем не менее, еще раз подчеркну, что данные замечания носят технический характер, не влияют на ценность работы и полученные результаты и не подвергают их сомнению и считаю, что Татьяна Викторовна, несомненно, заслуживает искомой степени кандидата химических наук по специальности биотехнология. Спасибо большое за внимание. Спасибо.

Мирошников А.И.: Пожалуйста, Татьяна Викторовна.

Толстова Т.В.: Я хотела поблагодарить за замечание. Будем в следующем обращать внимание на абсолютную погрешность и то, как правильно нам сокращать числа. Второй вопрос был связан с выражением набухаемости. Да, действительно, можно выражать ее в миллилитрах на грамм, можно в процентах. Если наши значения пересчитать, они будут порядка двух-трех тысяч процентов. Как-то у нас так сложилось, что мы миллилитры на грамм делаем. Можно выражать их в процентах, и в статьях оба варианта встречаются. И

что касается механических свойств матриц, что этому вопросу действительно в литературном обзоре стоило бы уделить побольше внимания. Вы также интересовались, сравнивали ли мы те механические свойства, которые у нас получились для наших матриц с другими матрицами тоже на основе хитозана. Мы провели такой анализ, посмотрели литературные источники, в действительности абсолютные значения механических свойств сильно варьируются в зависимости от протоколов измерений, помимо того, что очень сильно будет влиять и молекулярная масса хитозана, и вообще состав матрикса. Но тем не менее нам удалось найти значения, сопоставимые с теми, которые для наших матриц мы обнаружили. Но еще раз хочу сказать, что, наверное, мы и не ставили такой задачи: определить абсолютное значение. Все-таки хотелось бы посмотреть, как повлияло именно изменение состава на механические свойства. И последний вопрос, да, тоже касался опечаток. Да, благодарю за замечание. Спасибо.

Мирошников А.И.: Пожалуйста, второй оппонент, Анастасия Юрьевна Ефименко.

Ефименко А.Ю., оппонент: Глубокоуважаемый председатель, глубокоуважаемые члены диссертационного совета, коллеги. *(Излагает положительный отзыв)*. С большим интересом я работала над оппонированием этой диссертации. Благодарю за приглашение. Действительно, в регенеративной биомедицине на сегодняшний день огромное внимание уделяется развитию биоматериалов для разрабатываемых продуктов. Можно сказать, что, наверное, биоматериалы – это один из китов, на которых стоит это перспективное направление в биомедицинской науке. И вот прозвучало уже довольно много о материалах на основе того же хитозана. Да, действительно, это так. Но когда мы начинаем работать в области изучения реакции конкретных клеток или клеточных композиции, то сразу начинаются нюансы. И нам, как специалистам по разработке продуктов для регенеративной медицины, очень бы хотелось иметь материалы, с помощью которых мы можем не просто создавать трёхмерную структуру, скаффолд, каркас для ткани инженерных конструкций, но и управлять поведением клеток. И вот в этой диссертации одна из задач в этой области, на мой взгляд, была блестяще решена. С помощью подходов по использованию композитных биоматериалов, получения сополимеров синтетических и природных материалов удалось диссертантке добиться как раз создания новых композитов, с помощью которых можно по-разному влиять на биологические свойства клеток. Диссертация построена по традиционному плану, написана очень хорошим языком, логично, ясно, выстроено. Здесь вопросов практически никаких нет. Мы видели, что результаты опубликованы тоже очень достойно в профильных журналах. Я, если можно, перейду сразу к замечаниям. У меня было несколько вопросов по логике обзора литературы, который очень хорошо написан Татьяной Викторовной. Она действительно увлечена темой стволовых клеток, но мне бы хотелось обратить внимание, что в современной тканевой инженерии крайне активно используются и специализированные дифференцированные клетки, и даже в своей работе она, по факту, использовала фибробласты, являющиеся специализированными клетками, которые мы тоже очень часто используем. Уж для первых этапов тестирования новых биоматериалов совершенно однозначно. В обзоре этому было не уделено достаточно внимания. Меня очень удивило в работе такого уровня, выполненной на таком хорошем методическом уровне, отсутствие раздела статистического анализа, хотя во всех рисунках и на слайдах присутствовали методы и описательной статистики, и сравнительной статистики, но вот в диссертации это

как-то совсем не было описано. Ну и там некоторое количество опечаток. Из вопросов, которые являются серьезными, на мой взгляд, обсуждены были в диссертации недостаточно. Очень интересные, вы видели в презентации, результаты по реакции клеток на полученные сополимеры были совершенно явные различия в адгезии. И мышинные фибробласты, и мезенхимные стромальные клетки человека образовывали на разных сополимерах. Клетки в одних случаях очень хорошо распластаны, в других скорее сферической формы, что, собственно, показывает на влияние именно на их способность к прикреплению к полученным матриксам. И в реакциях в остеогенной среде дифференцировки совершенно четко на одном из видов матриксов образовывались сфероиды. С какими механизмами это было связано? Татьяна Викторовна пишет, что гидрофильно-гидрофобный баланс. Хотелось бы всё-таки услышать её мнение подробнее о том, какие могут быть механизмы влияния полученных сополимеров на эти свойства. И второй очень интересный результат – это доказанная стимуляция пролиферативного потенциала клеток для тканевой инженерии. Это крайне критический вопрос, потому что для более или менее существенной замены, я уже не говорю трансплантации, но даже просто в реконструктивной хирургии нормальной ткани инженерной конструкции нужно много клеток. И стимуляция пролиферативного потенциала в этом смысле такой интересный эффект. Каким образом удалось с вашей точки зрения добиться его с помощью сополимеризации с полилактидом такого эффекта? Вот два, наверное, ключевых вопроса, а остальные там в основном по мелочи в отзыве отражены. Спасибо большое за внимание. Коллеги, поздравляю с прекрасной работой.

Мирошников А.И.: Спасибо. Спасибо большое. Ответы?

Толстова Т.В.: Да, спасибо большое за вопросы. Мне было очень интересно на них отвечать и готовиться. Подготовлены тут некоторые слайды. Что касается литературного обзора, да, там действительно может показаться, что чуть-чуть где-то не хватает описания не стволовых клеток. Вы правы, мой научный интерес сейчас очень сильно на них сориентировался, и поэтому действительно я немножко позволила себе последовать своему научному интересу. Наверное, больше внимания следовало бы уделить не только стволовым клеткам, которые тоже активно используются при разработке матриксов.

Были также вопросы, согласно какому механизму мы предполагаем, может отличаться морфология одних и тех же клеток при их культивировании в 2D-условиях или когда мы их уже перемещаем на матрикс. В презентации мы не показывали, в диссертации и в автореферате есть, мы исследовали сначала культивирование клеток на пленках. Это схематично будет выглядеть вот так. И это похоже на стандартные условия культивирования *in vitro*. А потом мы эти же мышинные фибробласты и МСК помещали в 3D матрикс и видели, что морфология у этих клеток менялась. Я предполагаю, и в литературных данных уже описываются случаи, тут привожу несколько ссылок, что поскольку у нас в 2D условиях клетки контактируют с матриксом только односторонне, с соседними клетками, то у них не возникает никаких градиентов в концентрации растворенных веществ, питательных веществ, у них морфология вынуждена. И на самом деле это не совсем так в *in vivo* условиях. Это еще одно из преимуществ и интереса к 3D-моделям, в том числе сфероиды тоже к ним относятся, потому что здесь уже совершенно другие возникают новые свойства у клеток, в связи с тем, что появляется этот градиент биохимических факторов, а также клетка уже может взаимодействовать не только с

субстратом и двумя соседними клетками, но и с клетками в 3D-условиях, и это может повлиять на их морфологию. Так мы предполагаем, это послужило вот этим различием, наблюдаемым для одних и тех же клеток в 2D и 3D-условиях.

И вопрос, который был посвящен механизму, почему же у нас, и это действительно тоже интересно, почему у нас на пленках просто клетки стволовые обладали характерной морфологией, а когда мы индуцировали дифференцировку, на сополимерных пленках у нас образовались сфероиды. Для ответа на этот вопрос я сначала задумалась, почему сфероиды образуются, и оказалось, что у хитозана этот процесс происходит по уникальному механизму. Это не так, как обычно это происходит на не адгезионных подложках, это не так, как это происходит в висючей капле. И, согласно некоторым литературным источникам, в этом процессе принимают участие молекулы кальция и WNT-сигнальный путь. Дальше я начала смотреть, что же это такой за сигнальный путь. Оказалось, что он может активироваться по двум каноническим и неканоническим подпутям. И вот этот баланс, в какую сторону он будет смещаться, он будет определять и то, какой будет функционал у клеток. То есть, скорее всего, они будут дифференцироваться или будут пролиферировать. При этом при образовании сфероидов также неканонический сигнальный путь участвует в регуляции уровня кальция. Поэтому на первый вопрос, как вообще сфероиды образуются на пленках, мы делаем вывод, что в этом участвует WNT-сигнальный путь. Но почему же, когда мы просто посадили клетки на пленки, им совершенно не хотелось образовывать сфероиды. Вот мы запустили дифференцировку, и они у нас появились. Одним из таких спусковых факторов мог быть компонент среды — это дексаметазон, так как есть публикации, сообщающие о его влиянии. Но тут тоже, а почему тогда на хитозане они не образовались? В ряде публикаций сообщается о том, что на этот WNT-сигнальный путь и на то, в какую сторону он будет смещаться, будет влиять и состав матрикса, и гидрофильность, и жесткость, и уровень внутри- и внеклеточного кальция. Запуск этого пути, вероятно, участвовал в механизме образования сфероидов при индукции дифференцировки на сополимерных пленках. И в целом теперь интересно, захотелось проверить, можно всё это посмотреть, можно посмотреть, как активировался WNT-сигнальный путь, какой он был канонический или неканонический.

И вот, мне кажется, это же нам помогает ещё ответить на вопрос, про то, почему у нас пролиферативный потенциал на хитозановых матриксах усилился. То есть, вероятно, мы пока не можем, к сожалению, утверждать наверняка, вот когда мы культивировали на хитозановых матриксах, вот этот канонический путь активировался, и пролиферативный потенциал усиливался. А на сополимерных, наоборот, по этим же причинам, потому что влиял состав матрикса, вероятно, смещался в сторону дифференцировки. Это очень интересно. Я потратила много времени, но оно пролетело незаметно, пока искала ответы на эти вопросы.

Про статистические методы. Да, у нас действительно на какой-то из итерации диссертации нет раздела статистической обработки, но благо все задокументировано в статьях по теме диссертации, там везде написано. Мы использовали три партии образцов. Все эксперименты делали в трёх биологических, в трёх технических повторях, и результаты обрабатывали с помощью Prism и двухфакторного дисперсионного анализа

ANOVA. Поэтому хорошо, что в статьях это прописано. Да, действительно, почему-то в самом тексте диссертации в какой-то момент пропало. Благодарю за вопросы.

Мирошников А.И.: Спасибо. Коллеги, ну, открываем дискуссию, кто ещё желает похвалить нашего диссертанта? Или уже все высказались? Ну, если это так, то, Татьяна Викторовна, тогда снова на трибуну и благодарить своих коллег.

Толстова Т.В.: Чтобы никого не забыть, сделала специально слайд. Конечно, в первую очередь хотелось бы поблагодарить научного руководителя за веру, за идею, за то, что я оказалась в этой области на стыке материалов и на стыке клеточной биологии. Всему коллективу лаборатории, в частности лично Марии Дроздовой, вообще за эту атмосферу, за то, что у нас всегда есть какая-то такая научная дискуссия, пусть может быть уже на каких-то повышенных иногда тонах, мы уже там перекрикиваем друг друга, но всегда приходим в споре к истине. Конечно, руководителю и всем сотрудникам лаборатории прецизионных биосистем ИБМХ, где я сейчас работаю, потому что благодаря им мне удалось освоить вот эти все клеточные методы и как бы внести их сюда, к материалам. Сотрудникам лаборатории твердофазных химических реакций, лично Деминой Татьяне, Попыриной Татьяне, за то, что они нам предложили поработать с такими матриксами и вообще консультировали нас и при написании статьи, при написании этой работы, помогали при исследовании механических свойств пленок. Также сотрудникам лаборатории механики полимеров и композиционных материалов Института высокомолекулярных соединений РАН, где мы проводили исследование механических свойств гидрогелей, лично Смирновой Валентине Евгеньевне и Юдину Владимиру Евгеньевичу за то, что рассказали, всё показали, помогли посмотреть. И, конечно, ведущему научному сотруднику Института медико-биологических проблем Андреевой Елене Ромуальдовне и младшему научному сотруднику Матвеевой Диане Константиновне тоже за консультацию при работе со стволовыми клетками. Тоже у нас всегда такая приятная дискуссия, такое хорошее взаимодействие организовалось. Они нам, в частности, подсказали дифференцировку посмотреть, и как-то все завязалось. Ну и, конечно же, поблагодарить мою семью, моих родителей, они тут сегодня присутствуют, вот, и моего мужа, но он сегодня, к сожалению, тут не присутствует, за то, что, ну, в целом, направили меня, и все это у меня получилось. Все, спасибо.

Мирошников А.И.: Татьяна Викторовна, а Варламову вы тоже благодарность? Кто вам дает хитозан?

Толстова Т.В.: Нет, Вы знаете, я, конечно, Валерию Петровичу Варламову благодарна и вообще, в целом, у нас тоже с ним очень такое приятное взаимодействие произошло, когда мы отзыв ведущей организации готовили. Но хитозан у нас получают коллеги, собственно, в Институте синтетических и полимерных материалов, сами.

Мирошников А.И.: Ну из хитина?

Толстова Т.В.: Ну из хитина, да.

Мирошников А.И.: Ну идеолог-то Варламов.

Толстова Т.В.: Ну и хитин, наверное, у Варламова, да, берут. Да, да, конечно, идеолог Варламов.

