

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, по диссертации,
на соискание ученой степени кандидата химических наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 12 октября 2022 года № 23

О присуждении **Сочиловой Анастасии Владимировне** ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация “Материалы на основе хитозана и гиалуроновой кислоты для получения структурно-организованных скаффолдов в тканевой инженерии” по специальности 1.5.6. - Биотехнология принята к защите 29 июня 2022 года (протокол заседания № 18) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, г. Москва, ГСП-7, л. Миклухо-Маклая, д. 16/10), действующим на основании Приказов Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Социлова Анастасия Владимировна, 18 апреля 1993 года рождения. В 2017 году соискатель окончила магистратуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по специальности Биология, специализации Биоорганическая химия. С 2017 по 2021 гг. обучалась в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). Диплом об окончании аспирантуры (регистрационный номер 37) выдан 5 октября 2021 г. в ИБХ РАН. В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории полимеров для биологии ИБХ РАН. Диссертация выполнена в лаборатории полимеров для биологии ИБХ РАН.

Научный руководитель - доктор химических наук Генералова Алла Николаевна, главный научный сотрудник лаборатории полимеров для биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Филиппова Ольга Евгеньевна, доктор физико-математических наук, профессор Кафедры физики полимеров и кристаллов Физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», и **Григорьев Тимофей Евгеньевич**, кандидат физико-математических наук, заместитель руководителя по научной работе Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева», г. Москва, в своем положительном отзыве, подписанном д.х.н., доцентом, заведующим кафедрой биоматериалов РХТУ им. Д.И. Менделеева Межуевым Ярославом Олеговичем и утверждённом исполняющим обязанности ректора Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования РХТУ им. Д.И. Менделеева д.т.н. Воротынцевым Ильёй Владимировичем, указала, что диссертация Сочилиной Анастасии Владимировны является завершённой научно-квалификационной работой и полностью соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. No 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. No 335; 02.08.2016 г. No 748; 29.05.2017 г. No 650; 20.03.2021 г. No 426; 11.09.2021 г. No1539), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология.

Соискатель имеет 14 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 12 работ общим объёмом 6 печ. л. в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы данных Web of Science и Scopus). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме, в которые А.В. Сочилина внесла основной либо существенный вклад, включают:

1. Sochilina A. V., Savelyev A. G., Demina P. A., Sizova S. V., Zubov V. P., Khaydukov E. V., Generalova A. N. Quantitative detection of double bonds in hyaluronic acid derivative via permanganate ion reduction //Measurement Science and Technology. – 2019. – Т. 30. – №. 7. – С. 075102.
2. Sochilina A. V., Budylin N. Y., Gamisonia A. M., Chalykh A. E., Zubov V. P., Vikhrov A. A. Multichannel hydrogel based on a chitosan–poly (vinyl alcohol) composition for directed growth of animal cells //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2019. – Т. 184. – С. 110495.
3. Сочилина А. В., Савельев А. Г., Акасов Р. А., Зубов В. П., Хайдуков Е. В., Генералова А. Н. Получение модифицированной гиалуроновой кислоты с контролируемым

- содержанием винильных групп с целью создания скаффолдов методом фотоиндуцируемой реакции сшивки //Биоорганическая химия. – 2021. – Т. 47. – №. 4. – С. 486-494.
4. Savelyev A. G., Sochilina A. V., Borodina T. N., Akasov R. A., Kapitannikova A. Yu., Sholina N. V., Zvyagin A. V., Generalova A. N., Khaydukov E. V. Facile Cell-Friendly Hollow-Core Fiber Diffusion-Limited Photofabrication //Frontiers in bioengineering and biotechnology. – 2021. – Т. 9.
 5. Sochilina A. V., Akasov R. A., Arkharova N. A., Klechkovskaya V. V., Mironov A. V., Prostyakova A. I., Sholina N. V., Zubov V. P., Generalova A. N., Vikhrov, A. A. Fabrication of moldable chitosan gels via thermally induced phase separation in aqueous alcohol solutions //International Journal of Biological Macromolecules. – 2022. – Т. 215. – С. 501-511.
 6. Savelyev A. G., Sochilina A. V., Akasov R. A., Mironov A. V., Semchishen V. A., Generalova A. N., Khaydukov E. V., Popov V. K. Extrusion-based 3D printing of photocurable hydrogels in presence of flavine mononucleotide for tissue engineering //Современные технологии в медицине. – 2018. – Т. 10. – №. 1. – С. 88-92. .
 7. Sochilina A. V., Savelyev A. G., Demina P. A., Ierusalimsky N. V., Khochenkov D. A., Akasov R. A., Sholina N. V., Khaydukov E. V., Generalova A. N. Controlled modification of hyaluronic acid for photoinduced reactions in tissue engineering //Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing, 2018. – Т. 1124. – №. 3. – С. 031014.
 8. Sochilina A. V., Savelyev A. G., Sholina N. V., Karimov D. N., Nechaev A. V., Khaydukov E. V., Generalova A. N. Nanohybrid scaffolds with luminescent remote control //EPJ Web of Conferences. – EDP Sciences, 2018. – Т. 190. – С. 04022.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента д.ф.-м.н., профессора Филипповой Ольги Евгеньевны.
Отзыв положительный, содержит следующие замечания:
 - 1) В работе предложен оригинальный способ получения нанофибриллярных гелей хитозана. Однако, структура этих гелей недостаточно исследована. Для характеристики структуры, в частности, использовали метод сканирующей электронной микроскопии после лиофильного высушивания, т.е. в условиях, не позволяющих сохранить нативную структуру набухших гелей. Можно было бы попробовать использовать метод крио-просвечивающей электронной микроскопии.
 - 2) Перед исследованием гелеобразования хитозана в смеси воды и спирта, казалось бы, следовало бы определить диапазоны концентраций полимера, соответствующих разбавленным растворам, полуразбавленным растворам без зацеплений и полуразбавленным растворам с зацеплениями, например, методом вискозиметрии, и затем работать в области полуразбавленных растворов с зацеплениями.
 - 3) В работе проведены *in vivo* исследования хитозанового нанофибриллярного геля, ХТ-2/EtOH-47,5. Чем обоснован выбор данного типа гидрогеля?
 - 4) Во второй части работы автор связывает образование системы направленных каналов в гидрогелях, в частности, с комплексообразованием хитозана и поливинилового спирта. За счет чего образуются комплексы? Как экспериментально можно показать наличие указанных комплексов?

- 5) В таблице 3.3 приведены значения модуля Юнга гелей с указанием ошибки измерений, например, 539 ± 54 кПа. Полученные данные следует откорректировать, так как ошибка в 54 кПа означает, что число 539 следовало бы округлить до десятков.
 - 6) В работе используются некоторые некорректные термины, например, «желирование» вместо «гелеобразование», «набухаемость» вместо «набухание», «степень набухаемости» вместо «степени набухания», «фотоинициация» вместо «фотоиницирование».
2. Отзыв официального оппонента к.ф.-м.н. Григорьева Тимофея Евгеньевича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:
- 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 при температуре 37°C и желательно в фосфатном буфере.
 - 3) При исследовании реологических свойств растворов 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.
 - 4) При исследовании взаимодействия клеток с полученными материалами следует отдельно описать планируемые способы применения материалов в тканевой инженерии в области пористости и миграции клеток в объем материала. В некоторых случаях пористость разработанных гидрогелей как таковых недостаточна для активного проникновения клеток в объем матрикса.
3. Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:
- 1) В работе продемонстрирован направленный рост клеток в микроканалах хитозана на примере линии глиомы С6, однако, желательно было бы также провести аналогичные исследования на примере клеток нейронов или изучить эти скаффоды *in vivo*.
 - 2) Несмотря на перспективность использования фталоцианина для фотоиндуцированной сшивки красным светом внутри живых организмов, в работе не хватает

гистологических исследований скаффолдов на основе гиалуроновой кислоты с производным фталоцианина, что могло бы дополнить выводы о биосовместимости.

- 3) В главе “Обзор литературы” некоторые разделы описаны достаточно подробно, как, например, подглавы, посвящённые природным полимерам и реакциям ковалентной сшивки, в то время как другие – например, реакции нековалентной сшивки – описаны гораздо в меньшем объёме.
- 4) В диссертации присутствуют ошибки и опечатки. Также желательно выполнять таблицы и графики в едином стиле.
4. Отзыв на автореферат от профессора центра фотоники и квантовых материалов Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий» д.х.н. Горина Дмитрия Александровича. Отзыв положительный, замечаний по автореферату нет.
5. Отзыв на автореферат от члена-корреспондента РАН, профессора и заведующего кафедрой химии и технологии высокомолекулярных соединений имени С.С. Медведева Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет» д.х.н. Чвалуна Сергея Николаевича. Отзыв положительный, замечаний по автореферату нет

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области химии полимеров, в том числе полисахаридов, полимерных гелей и биоматериалов на их основе, которые подтверждены сериями их публикаций в российских и международных журналах. Официальный оппонент Филиппова О.Е. является ведущим специалистом в области изучения свойств и структуры полисахаридных гелей, в том числе и на основе хитозана. Тематика работ официального оппонента Григорьева Т.Е. связана с изучением свойств гидрогелевых материалов и скаффолдов в том числе и в биологических средах. Коллектив ведущей организации занимается вопросами разработки инновационных методов формирования биосовместимых скаффолдов. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований были разработаны новые методы формирования и изучены свойства скаффолдов различной структуры на основе нековалентной сшивки хитозана, а также разработан подход к формированию скаффолдов на основе модифицированной гиалуроновой кислоты методом фотоиндуцированной сшивки с настраиваемыми свойствами, кроме того, впервые была продемонстрирована возможность формирования

таких скаффолдов непосредственно в организме в присутствии производного фталоцианина в качестве фотоинициатора. Доказана перспективность применения всех полученных скаффолдов для тканевой инженерии.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что: предложены механизмы формирования нанофибриллярных гелей и выявлены закономерности формирования гелей с системой направленных каналов на основе хитозана, изучены физико-химические свойства растворов и фотокомпозиций модифицированной гиалуроновой кислоты в зависимости от степени замещения глицидилметакрилатом.

Практическая значимость работы. Разработанные методики формирования скаффолдов на основе хитозана и модифицированной гиалуроновой кислоты обладают большим потенциалом применения в медицинской сфере, в частности, в тканевой инженерии после прохождения необходимых этапов доклинических и клинических испытаний. Такие скаффолды перспективны и как носители для культивирования клеток и формирования новой ткани, и как имплантаты для регенерации травмированных тканей.

Степень достоверности результатов исследования сомнений не вызывает и подтверждена использованием набора различных методов исследований, как простых и общедоступных, так и высокотехнологичных. Технологическая база работы соответствует основным концепциям, принятым в современной науке, полученные результаты продемонстрировали воспроизводимость и не противоречат другим литературным данным.

Сочилина А.В. принимала активное участие в большей части исследований – постановка задачи и планирование, модификация гиалуроновой кислоты и определение степени замещения модифицированной гиалуроновой кислоты, подбор состава водно-спиртовых композиций хитозана и фотоотверждаемых композиций гиалуроновой кислоты, характеристика гидрогелей на основе модифицированной гиалуроновой кислоты и хитозана, проведение некоторых экспериментов *in vitro* и *in vivo*, обсуждение и литературное оформление полученных результатов. Большая часть экспериментального материала работы получена лично автором, за исключением: некоторых экспериментов по изучению структуры хитозановых гелей с направленными каналами, проведённых совместно с сотрудниками ИФХЭ им. А.Н. Фрумкина РАН; части процессов формирования и изучения структуры скаффолдов из модифицированной гиалуроновой кислоты, проведённых при участии сотрудников ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН; *in vitro* и *in vivo* испытаний, проведённых под руководством коллег из РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Сеченовского университета и ННГУ им. Лобачевского; биовизуализации, проведённой сотрудниками Инновационного центра «Сколково».

Диссертационный совет 24.1.037.01 постановил, что диссертационная работа Сочилиной Анастасии Владимировны является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена научно-техническая задача разработки подходов к получению новых типов скаффолдов на основе полисахаридов с регулируемыми свойствами, что вносит существенный вклад в развитие исследований в области биотехнологии и может найти применение в тканевой инженерии. Работа содержит новые и актуальные научные результаты и по своему содержанию соответствует паспорту специальности 1.5.6. – Биотехнология в пункте 8. Таким образом диссертационная работа **Сочилиной Анастасии Владимировны** “Материалы на основе хитозана и гиалуроновой кислоты для получения структурно-организованных скаффолдов в тканевой инженерии”, 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», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации 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).

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания и вопросы:

- 1) Какие были предприняты меры, чтобы избежать схлопывания гелей при исследовании структуры методом сканирующей электронной микроскопии, подразумевающей использование вакуума? Как проверяли изменение структуры при пробоподготовке? Были ли использованы альтернативные методы исследования структуры?
- 2) Характер изложения материалов достаточно однобок: мало сказано о конкретных данных. Например, сказано о степени сшивки, но не представлены значения, определяли модуль Юнга, но не показан, какой именно гель был в результате сформирован, на что он был похож. Расскажите более конкретно, что Вы получили.
- 3) Изучали ли Вы биодegradацию гидрогелей и какой получили результат?
- 4) Что являлось источником хитозана и гиалуроновой кислоты? Какая была молекулярная масса хитозана? Из чего получают гиалуроновую кислоту?
- 5) Проверяли ли скаффолды для тканевой инженерии *in vivo*? Для фотоиндуцированного сшивания использовался флавиномононуклеотид, активируемый УФ или синим светом, которые плохо проходят сквозь кожные покровы, были ли проблемы при формировании скаффолдов в организме?

Соискатель Сочилина А.В. ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы:

- 1) Для сканирующей электронной микроскопии гели замораживали и лиофильно высушивали для сохранения их структуры, однако даже при такой обработке структура геля может изменяться. Для предотвращения изменений за счёт роста кристаллов льда использовали шоковую заморозку жидким азотом. Несмотря на то, что не была доказана полная сохранность внутренней морфологии, целью исследования являлась прежде всего фиксация изменений структуры между образцами при вариации параметров (например, как в случае нанофибриллярных гелей). Альтернативные методы исследования не использовали.
- 2) Определение степени сшивки производили косвенным способом с помощью перманганата калия, вступающего в реакцию с непрореагировавшими винильными группами, однако такой метод не позволяет получать абсолютные значения из-за медленной диффузии реактива, и его можно применить только для сравнения образцов между собой (например, при изменении времени облучения). Касательно механических свойств скаффолдов: после проведения фотоиндуцированной сшивки, модуль Юнга колебался от 0,5 до 2 МПа, в таком диапазоне гидрогели по плотности напоминают хрящевую ткань.
- 3) Деградация сшитых гидрогелей на основе модифицированной гиалуроновой кислоты была сначала изучена *in vitro* в растворе фермента гиалуронидазы высокой концентрации при 37 °С. Гидрогели сохраняли свою форму поскольку время инкубации составляло всего 3 часа. Полученные данные нельзя экстраполировать на биодеградацию скаффолдов в организме, поскольку данный эксперимент был проведён прежде всего для сравнения образцов между собой в зависимости от степени замещения. Было показано, что степень ферментативной деградации падает при повышении степени замещения. При проведении *in vivo* испытаний гидрогелей на основе хитозана и на основе модифицированной гиалуроновой кислоты в большинстве случаев скаффолды сохраняли свою форму в организме даже спустя продолжительное время.
- 4) В работе использовались готовые препараты хитозана и гиалуроновой кислоты, самостоятельная обработка природных источников не производилась. Молекулярная масса хитозана составляет 300-500 кДа, степень деацетилирования 92%. Гиалуроновую кислоту чаще всего получают из куриных гребешков.
- 5) Да, эксперименты *in vivo* были. Для проведения фотосшивки внутри организма флавиномононуклеотид не применялся, использовали другой фотоинициатор, производное фталоцианина, которое активируется красным светом, способным проникать сквозь ткани организма.

На заседании 12.10.2022 г. диссертационный совет постановил за решение научной задачи разработки новых методов формирования биосовместимых гидрогелевых скаффолдов на основе природных полисахаридов, имеющей важное значение для развития биотехнологии, а также тканевой инженерии присудить Сочилиной А.В. ученую степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 8 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.5.6. - Биотехнология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 23, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А. И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В. А.

13 октября 2022 г.