



МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное
бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
**«Российский химико-технологический
университет имени Д.И. Менделеева»**

Миусская пл., д. 9, Москва, 125047
Тел.: +7 (499) 978-86-60; Факс: +7 (495) 609-29-64
E-mail: pochta@muctr.ru; https://www.muctr.ru
ОКПО 02066492; ОГРН 1027739123224
ИНН/КПП 7707072637/770701001

№ _____
на № _____ от _____

"УТВЕРЖДАЮ"

И.о. ректора
Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования

«РХТУ им. Д.И. Менделеева»

д.т.н., проф. И.В. Воротынцева.

« 14 » _____ 2022 г.



ОТЗЫВ

**ведущей организации 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**

Диссертационная работа Сочилиной А.В. является междисциплинарным исследованием и посвящена разработке новых методов получения структурно-организованных скаффолдов на основе природных полисахаридов и изучению их свойств для решения задач тканевой инженерии, которая является динамично развивающейся областью регенеративной медицины.

Природные полисахариды хитозан и гиалуроновая кислота представляют большой интерес для получения гидрогелевых матриц, так называемых скаффолдов, обеспечивающих рост клеток, что позволяет их рассматривать в качестве тканеинженерных конструкций. Скаффолды на основе данных полисахаридов при отсутствии цитотоксичности и иммуногенности обладают такими важными характеристиками, как биосовместимость с тканями живых организмов, способность к ферментативному гидролизу в них, а также позволяют получать механически прочные пористые структуры. В настоящее время представлено большое количество методов формирования скаффолдов из хитозана и гиалуроновой кислоты, однако разработка

подходов к созданию трёхмерных изделий с контролируемыми химическими, физико-механическими свойствами, совместимыми с повреждёнными тканями, представляет собой перспективное направление развития тканевой инженерии. Решению данной **актуальной задачи** посвящена диссертационная работа Сочилиной А.В.

Диссертационная работа изложена на 132 страницах, содержит 39 рисунков, 17 схем и 4 таблицы, и построена по традиционной схеме, которая включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, содержащую материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы, список литературы.

В главе «Обзор литературы» рассмотрены основные задачи современной регенеративной медицины, связанные с созданием тканеинженерных конструкций на основе гидрогелевых скаффолдов, которые в наибольшей степени подходят для включения клеток. Эти задачи связаны с такими особенностями гидрогелей, как: большое содержание воды, наличие структуры, напоминающей межклеточный матрикс, и механические свойства, во многом схожие со свойствами мягких тканей организма. Представлены основные типы материалов для формирования гидрогелевых скаффолдов, такие как синтетические и природные полимеры, описаны основные подходы к формированию гидрогелей через образование ковалентных и нековалентных связей. Приведены основные принципы формирования гидрогелевых скаффолдов с использованием реакции нековалентной сшивки, активируемой введением ионов металлов, изменением температуры или рН среды. При описании реакций ковалентной сшивки особое внимание уделено радикальным реакциям, индуцированным светом, которые являются перспективными для получения гидрогелей с помощью лазерных технологий. Представлена классификация фотоинициаторов и механизм их действия. Кроме того, в данном разделе рассмотрены технологии получения скаффолдов с различной структурой, такие как: формование, основные виды трёхмерной печати с использованием лазерного облучения, электроспиннинг, выщелачивание порогенов и др.

Освещение широкого круга задач при получении гидрогелевых скаффолдов, представленное с использованием современных литературных данных, позволили Сочилиной А.В. сформулировать цель и задачи диссертационной работы.

Достоверность приведённых результатов подтверждается использованием комплексных современных методов исследования и разработанных методов и технологий, описанных в главе «Материалы и методы».

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из двух частей, представляющих собой два различных подхода к получению новых гидрогелевых скаффолдов на основе хитозана и гиалуроновой кислоты и исследованию их свойств. В первой части

рассмотрено формирование гидрогелей на основе хитозана, реализованное с помощью различных методов нековалентной сшивки. В первом методе желирование хитозана протекает при снижении температуры. Особенностью этого метода в данной работе является использование условий, исключающих замерзание растворов хитозана за счёт использования водно-спиртовой среды, что позволяет формировать прозрачные гели с равномерной наноприбриллиарной структурой и высоким модулем упругости. Представленный метод состоит из двух стадий, на первой из которых происходит образование термообратимого геля, а на второй – его фиксация раствором щёлочи. Двухстадийность процесса позволяет получать скаффолды с использованием разъёмных силиконовых форм и экструзионной технологии трёхмерной печати на охлаждающей подложке.

Второй метод заключается в формировании особой системы микроканалов в объёме гидрогеля, направленных параллельно друг другу. Образование и рост микроканалов обусловлены процессом фронтального осаждения, в ходе которого на кислый раствор хитозана наносят раствор щёлочи, а также связаны с формированием комплексов хитозана с поливиниловым спиртом. В работе подробно рассматриваются условия получения и свойства гидрогелей с микроканальной структурой, а также перспективы их применения для лечения разрывов периферических нервов за счёт направления роста отростков нейронов в ходе регенерации.

Вторая часть главы «Результаты и их обсуждение» посвящена созданию гидрогелевых конструкций из гиалуроновой кислоты при использовании реакции фотоиндуцированной лазерной сшивки. В работе представлен способ модификации гиалуроновой кислоты, позволяющий контролируемо вводить винильные группы, необходимые для реакции ковалентной сшивки. Показано, что степень замещения винильными группами является ключевым параметром, который позволяет настраивать свойства гидрогелевых конструкций. Для этого был разработан количественный метод определения концентрации двойных связей в модифицированной гиалуроновой кислоте и исследованы зависимости степени замещения от состава исходной смеси и условий реакции. Реакцию фотосшивки модифицированной гиалуроновой кислоты проводили лазерным излучением при 450 нм в присутствии производного витамина В2 (флавинов мононуклеотид), выступающего в качестве фотоинициатора. Следует отметить удачный выбор фотоинициатора, обусловленный его биосовместимостью и отсутствием темновой цитотоксичности. В работе продемонстрированы различные технологии получения скаффолдов, как стандартное отверждение в специальных силиконовых формах, так и экструзионная 3D печать. Кроме того, в ходе работы был разработан новый способ

получения трубчатых конструкций за счёт диффузии фотоинициатора в процессе экструзии раствора модифицированной гиалуроновой кислоты и продемонстрировано выживание клеток в стенках таких конструкций. Принципиально новой разработкой является использование в качестве фотоинициатора водорастворимого производного фталоцианина, возбуждаемого излучением из «окна прозрачности» биологической ткани (670 нм). Это позволило провести желирование гидрогелей модифицированной гиалуроновой кислоты непосредственно после её введения под кожу животного. Кроме того, при помощи флуоресценции данного производного фталоцианина была показана прижизненная визуализация скаффолда.

Основные результаты диссертации были опубликованы в 12 статьях и представлены на 8 российских и международных конференциях. Автореферат соответствует содержанию работы. Новизна и актуальность представленной междисциплинарной работы не вызывают сомнений, как и её практическая значимость.

Научная новизна диссертации состоит в следующем: разработано два новых способа получения нековалентно сшитых гидрогелевых скаффолдов из хитозана с различной внутренней структурой – нанофибриллярной и ориентированной микроканальной – на основе метода термоиндуцированного желирования и метода фронтального осаждения соответственно. Установлено, что скаффолды различной формы и архитектуры возможно получать из гиалуроновой кислоты, модифицированной глицидилметакрилатом, методом фотоиндуцированной ковалентной сшивки в присутствии флавин мононуклеотида и пиридин-замещённого фталоцианина в качестве фотоинициаторов. Кроме того, показано, что эффективным инструментом управления свойствами таких скаффолдов является степень замещения гиалуроновой кислоты группами глицидилметакрилата, а для её быстрого определения был разработан новый количественный экспресс-метод на основе реакции винильных групп с перманганатом калия.

Практическая значимость работы заключается в потенциальной возможности применения разработанных методик формирования скаффолдов на основе хитозана и модифицированной гиалуроновой кислоты в медицинской сфере, в частности, в тканевой инженерии после прохождения необходимых этапов доклинических и клинических испытаний. Такие скаффолды можно использовать и как носители для культивирования клеток и формирования новой ткани, и как имплантаты для регенерации травмированных тканей.

Разработанные автором методы формирования гидрогелей на основе хитозана и гиалуроновой кислоты, направленные на создание скаффолдов и имплантатов, могут быть

использованы в ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”, ИБХ РАН, ИБХФ РАН, РХТУ им. Д.И. Менделеева и других профильных учреждениях, выполняющих работы в медико-биологических и биотехнологических областях.

По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям диссертация Сочилиной А.В. **соответствует паспорту специальности** научных работников 1.5.6. Биотехнология по пункту 8 – разработка научно-методических основ для применения стандартных биосистем на молекулярном, клеточном, тканевом и организменных уровнях в научных исследованиях, контроле качества и оценки безопасности использования пищевых, медицинских, ветеринарных и парфюмерно-косметических биопрепаратов.

В целом диссертация Сочилиной А.В. производит положительное впечатление. **Однако имеются следующие замечания по диссертационной работе:**

- 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*.
- Несмотря на перспективность использования фталоцианина для фотоиндуцированной реакции сшивки светом из красного диапазона в живых организмах, в работе не хватает гистологических исследований скаффолдов на основе гиалуроновой кислоты с производным фталоцианина, что могло бы дополнить выводы о биосовместимости.
- В главе “Обзор литературы” некоторые разделы описаны достаточно подробно, как, например, подглавы, посвящённые природным полимерам и реакциям ковалентной сшивки, а другие – например, реакции нековалентной сшивки – описаны в гораздо меньшем объёме.
- В диссертации присутствуют ошибки и опечатки. Также желательно выполнять таблицы и графики в едином стиле.

Данные недостатки являются непринципиальными и не снижают благоприятного впечатления от работы.


По совокупности актуальности, научной новизны, теоретической и практической значимости диссертационная работа Сочилиной Анастасии Владимировны «Материалы на основе хитозана и модифицированной гиалуроновой кислоты для получения структурно-организованных скаффолдов в тканевой инженерии», представленная на соискание учёной

степени кандидата химических наук, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи разработки подходов к созданию трёхмерных изделий с контролируемыми химическими и физико-механическими свойствами для адаптации к замещаемым тканям организма, имеющей значение для развития отрасли знаний в части применения структурно-организованных скаффолдов в тканевой инженерии, и соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением 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; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а Сочилина Анастасия Владимировна несомненно заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Кафедры биоматериалов Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева" (протокол № 14 от 12 сентября 2022 г.)

Отзыв подготовил:

Доцент, доктор химических наук,
заведующий кафедрой биоматериалов
РХТУ им. Д.И. Менделеева
«12» сентября 2022 г.



Межуев. Я.О.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева",
Адрес: 125047, г. Москва, Миусская площадь, д. 9
Тел.: +7-926-549-69-85
Почта: mezhuev.i.o@muctr.ru

Подпись доцента, доктора химических наук, заведующего кафедрой биоматериалов
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего
образования "Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева"
Межуева Я.О.

у д о с т о в е р я ю

Учёный секретарь РХТУ им. Д.И. Менделеева

доцент, к.т.н.



Н.К. Калинина