

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ИБХ РАН

12 октября 2022 года

**Защита диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук**

Сочилиной Анастасии Владимировны

**По теме: «Материалы на основе хитозана и модифицированной гиалуроновой
кислоты для получения структурно организованных скаффолдов в тканевой
инженерии»**

Специальность 1.5.6 – «Биотехнология»

Москва - 2022

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 12 октября 2022 года

Председатель
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Мирошников А.И.

Учёный секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 23 человека, из них докторов по профилю диссертации – 8.

1.	Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
2.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
3.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
4.	Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
5.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.4.9)
6.	Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
7.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(1.5.6)
8.	Академик РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(1.5.6)
9.	Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
10.	Академик РАН, д.б.н.	Деев Сергей Михайлович	(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.	Академик РАН, д.б.н.	Лукьянов Сергей Анатольевич	(1.5.3)
17.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
18.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
19.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
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.	Шапаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
23.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

Мирошников А.И., председатель:

А вторая защита у нас: Сочилина Анастасия Владимировна, “Материалы на основе хитозана и гиалуроновой кислоты для получения структурно-организованных скаффолдов в тканевой инженерии” на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности “Биотехнология”, научный руководитель доктор химических наук Генералова Алла Николаевна. Официальные оппоненты: Филиппова Ольга Евгеньевна, доктор физ.-мат. наук, профессор Кафедры физики полимеров и кристаллов Физфака МГУ, Григорьев Тимофей Евгеньевич, кандидат физ.-мат. наук, заместитель руководителя по научной работе Курчатовского комплекса НБИКС, из Курчатника. Ведущая организация: Менделеевский институт, “Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева”. Пожалуйста, значит.

Олейников В.А., ученый секретарь:

Материалы личного тела.

Мирошников А.И., председатель:

Да.

Олейников В.А., ученый секретарь:

Значит, Сочилина Анастасия Владимировна, гражданка Российской Федерации, бакалавриат окончила в 2015 году, в 2017 – магистратуру, это в Московском государственном университете, МГУ имени М.В. Ломоносова. С 2017 по 2019 год инженер-исследователь, с 2019 года младший научный сотрудник лаборатории лазерной биомедицины Федерального научно-исследовательского центра “Кристаллография и фотоника” РАН, с 2019 года по настоящее время младший научный сотрудник лаборатории полимеров для биологии нашего института. С 2017 по 2021 год обучалась в аспирантуре ИБХ РАН, кандидатский экзамен по специальности “биотехнология” сдан с оценкой “отлично”. Работа выполнена в лаборатории полимеров для биологии нашего института. Научный руководитель, как уже было сказано, Алла Николаевна Генералова. И по теме диссертации опубликовано 12 печатных работ в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите, автореферат и диссертация размещены на сайте ВАК вовремя 22 июля 2022 года, и все необходимые документы в деле имеются.

Мирошников А.И., председатель:

Спасибо. Вопросы к Владимиру Александровичу есть? Нет. Анастасия Владимировна, пожалуйста.

Сочилина А.В., соискатель:

(излагает основные положения диссертационной работы)

Мирошников А.И., председатель:

Спасибо. Пожалуйста, вопросы. Да, Николай Владимирович.

Бовин Н.В.:

Снова два, если не возражаете.

Мирошников А.И., председатель:

Да, пожалуйста.

Бовин Н.В.:

Первый относительно методов изучения гидрогелей, которые Вы получаете. Основной метод, который Вы применили это – электронная микроскопия. Так как техника проведения такого эксперимента требует вакуума, то для гидрогелей, гелей вообще, электронная микроскопия представляется чрезвычайно рискованной методологией. Вопрос такой: не могли бы Вы нам рассказать, какие Вы предприняли меры, чтобы эти гели не схлопывались в вакууме, и какие методы контроля, какие Вы можете привести нам аргументы, что при тех методах, которые Вы применяли, пробоподготовки, Вы не получили совершенно иной материал, чем тот был до высушивания в вакууме?

Сочилина А.В., соискатель:

Большое спасибо за вопрос, этот вопрос уже неоднократно задавали, и действительно при высушивании гидрогелей, в которых большая часть это, ну, большая часть структуры представляет собой воду, и процент полимера там мал, при высушивании может меняться структура, и да, она меняется. Для предотвращения этих изменений образцы предварительно замораживали, причём замораживали не просто в холодильнике, проводили заморозку жидким азотом, то есть, шоковая заморозка, которая по большей части исключает формирование кристаллов льда, которые также могли бы повлиять на структуру этих гидрогелей. К сожалению, тут нельзя сказать с точностью, что именно такая же структура у гидрогелей невысушенных, то есть такая же, как у лиофильно высушенных, однако целью работы всё же, в частности если брать нанофибриллярные гидрогели хитозана, целью работы было сравнение изменение структуры между образцами, а не выявление истинного размера элементов структуры.

Бовин Н.В.:

То есть, альтернативные способы, альтернативные методы исследования, которые подтвердили бы результаты электронной микроскопии, Вы не проводили?

Сочилина А.В., соискатель:

К сожалению, не пробовали. Мы бы хотели провести высушивание другими методами, например, в субкритическом диоксиде углерода, или может быть попробовать крио-

ТЭМ, однако такие методы требуют более сложного оборудования или, в общем, их сложнее осуществить в нашем случае было.

Бовин Н.В.:

Хорошо, тогда второй, даже скорее не вопрос, а просьба. Ваш характер изложения материалов в Вашем докладе он был сильно однобокий. Вы рассказывали, какими методами Вы пользовались, то есть, Вы рассказывали, как Вы делали, но очень мало было сказано о том, что Вы получили, конкретные цифровые результаты. Ну, например, Вы говорили, как Вы определяли степень сшивки гиалуроновой кислоты, но Вы не показали, собственно, каких степеней сшивки Вы достигли. Так, или Вы говорили про модуль Юнга, что Вы его определяли таким-то, таким-то образом, но что в результате Вы получили, в результате этих измерений, какие гели, то есть, это действительно гель или, условно говоря, кирпич по жёсткости, Вы тоже не сказали. И вот это прошло через весь Ваш доклад. Не могли бы Вы, может быть, мы потратим ещё какое-то время, Вы расскажете всё-таки чуть больше о тех результатах, которые Вы получили, то есть, рассказали, что Вы получили, а не как Вы это получали?

Сочилина А.В., соискатель:

Спасибо за вопрос. Правильно ли я поняла, что Вы спрашиваете, может быть, про фотографии каких-то скаффолдов или...?

Бовин Н.В.:

Ну вот даже эти конкретные два вопроса. Какие степени сшивки Вы получали?

Сочилина А.В., соискатель:

Степень сшивки мы не определяли. Точнее, у нас была методика косвенного определения степени сшивки, тоже перманганатным методом, поскольку перманганат будет реагировать с остаточными двойными связями, которые не вступили в сшивку. Однако для этого приходится размалывать скаффолд, к тому же такой метод не является точным из-за медленной диффузии перманганата вглубь скаффолда. То есть, мы могли показать динамику, то есть как она меняется, если изменять время облучения, однако абсолютного значения мы не можем получить. Это первое.

Бовин Н.В.:

Но хотя бы приблизительно.

Сочилина А.В., соискатель:

В смысле, какой процент сшивки? Какой процент групп вступили в реакцию?

Бовин Н.В.:

Ну хотя бы так, да.

Сочилина А.В., соискатель:

Опять же, в зависимости от того, какое облучение было, можно в районе от 30 до 50% получить. Но опять же, это очень условные значения, это не абсолютные. Их можно использовать только для сравнения между образцами.

Бовин Н.В.:

Хорошо. Про модуль Юнга, что Вы можете, как Вы можете прокомментировать результат. Насколько изменилась жёсткость геля после того, как... или вообще это уже теперь не гель после сшивки?

Сочилина А.В., соискатель:

То есть, описать вид геля после сшивки?

Бовин Н.В.:

Вы определяли модуль Юнга. Вот какой он был до сшивки, и какой он был после сшивки, и как Вы это интерпретировали?

Сочилина А.В., соискатель:

До сшивки мы не определяли, потому что это композиция, это жидкость, ну, текучая. Измеряли мы компрессионный модуль Юнга, то есть, сдавливанием уже готовых гидрогелей. Ранее я рассказывала про хитозановые нанофибриллярные гели, тут мы также приводили модуль Юнга. Для сравнения здесь приводятся также данные литературные о том, что модуль Юнга хрящевой ткани составляет, вот эти значения: от 0,45 до 0,8 мегапаскаль. То есть, вот в таком диапазоне гидрогели, они напоминают хрящевую ткань по плотности, по каким-то органолептическим свойствам, которые органолептическими методами можно исследовать. Что ещё могу сказать... Вот.

Бовин Н.В.:

Хорошо. И ещё к этому. Вы произнесли слова про биodeградируемость, когда Вы сшиваете гиалуроновую кислоту. И опять-таки это вопрос к степени сшивки. Вы слова произнесли, но что всё-таки Вы получили? Изучали ли Вы на самом деле эту биodeградацию? Если изучали, то какой результат? Насколько происходит биodeградация, и как это делалось?

Сочилина А.В., соискатель:

Спасибо за вопрос. Изучали мы, первое изучение было *in vitro*, то есть мы формировали образцы гидрогеля методом молдинга как раз-таки, и исследовали деградацию в растворе гиалуронидазы при 37 градусах. Опять же в данном случае мы сравнивали образцы между собой, то есть эти данные нельзя напрямую экстраполировать на организм, то есть как там будет биodeградироваться в среде организма, потому что бралось заведомо большое количество этого фермента. Но тут мы показали, как меняется степень деградации от степени замещения, ну, да она падает с повышением

степени замещения. Второе, мы изучали гидрогели, ну, мы проводили *in vivo* испытания гидрогелей. Действительно, они слабо деградировали даже спустя месяц эксперимента, то есть в большинстве случаев скаффолды сохраняли свою форму даже спустя вот такое продолжительное время.

Бовин Н.В.:

А уточните всё-таки про эксперимент *in vitro* с гиалуронидазой, что в результате вы получили? Если взять самую низкую степень сшивки, после обработки гиалуронидазой Вы получаете что-то уже жидкое, как исходный гель, или всё-таки остаётся это твёрдоподобным?

Сочилина А.В., соискатель:

Оно остаётся твёрдым. В данном случае мы проводили достаточно быстрый эксперимент, то есть инкубация шла в течение 3 часов, поэтому да, скаффолды, сохраняют свою форму.

Бовин Н.В.:

То есть, это на самом деле не эксперимент по биодegradации?..

Сочилина А.В., соискатель:

Нет, это не эксперимент по биодegradации, извините, что перебила.

Бовин Н.В.:

Хорошо, спасибо.

Мирошников А.И., председатель:

Спасибо.

Сочилина А.В., соискатель:

Спасибо.

Мирошников А.И., председатель:

У меня вопрос. Скажите пожалуйста, а что являлось источником хитозана и гиалуриновой кислоты.

Сочилина А.В., соискатель:

Спасибо за вопрос. А Вы имеете в виду?..

Мирошников А.И., председатель:

Ну, хитин откуда? Или Вы брали просто хитозан? Потому что источников хитина есть несколько.

Сочилина А.В., соискатель:

Спасибо за вопрос. Мы сами не производили хитозан, мы уже покупали готовый хитозан.

Мирошников А.И., председатель:

А по молекулярной массе тоже не знаете?

Сочилина А.В., соискатель:

Есть данные. Сейчас скажу. Вот. У него молекулярная масса от 300 до 500 килодальтон, и степень его деацетилирования составляет 92%.

Мирошников А.И., председатель:

А гиалуроновую кислоту тоже покупали продажную?

Сочилина А.В., соискатель:

Да, мы её не получали.

Мирошников А.И., председатель:

А источник гиалуроновой кислоты Вы знаете?

Сочилина А.В., соискатель:

Чаще всего используются, насколько я помню, куриные гребешки, вот.

Мирошников А.И., председатель:

Ну понятно. Ещё вопросы, пожалуйста. Да.

Деев С.М.:

Спасибо большое, очень интересная работа. Скажите, я правильно понял, что Вы тканевую инженерию в том числе и *in vivo* делали?

Сочилина А.В., соискатель:

Спасибо за вопрос. Да у нас были эксперименты *in vivo*, то есть для хитозана были...

Деев С.М.:

Да, в таком случае да, я просто, чтобы ускорить. Тогда меня интересует фотоиндуцируемое сшивание Ваших структур. И Вы использовали для этого рибофлавин или его производное, значит, флавиномононуклеотид. Встречали ли Вы проблемы с тем, что, насколько я знаю, для того, чтобы произошла фотоиндукция, нужно облучение ультрафиолетом или синим светом, который очень плохо, несколько десятков микрон, проникает через ткани покрова, кожного покрова. Встречали ли Вы проблемы с этим, и если да, то как Вы это решали?

Сочилина А.В., соискатель:

Спасибо за вопрос. Да, действительно, флавиномононуклеотид, здесь его спектр приведён, он может активироваться как в ультрафиолетовом диапазоне, так и в видимом. Однако, для проведения сшивки внутри организма мы использовали другой фотоинициатор, это производное фталоцианина, которое как раз-таки активируется уже красным светом, который проникает сквозь ткани. То есть флавиномононуклеотид мы не использовали для создания скаффолдов в организме, мы создавали скаффолды только *in vitro*.

Деев С.М.:

Спасибо.

Мирошников А.И., председатель:

Ещё вопросы? Не вижу. Спасибо, спасибо. Отдохните немножко. Алла Николаевна, будьте добры.

Генералова А.Н., научный руководитель:

Добрый день, уважаемые члены диссертационного совета и коллеги. Ну, я могу только сказать положительные слова и охарактеризовать Настю и Настину работу. Она к нам пришла на 4-ом курсе, выполнила очень успешно магистерскую и бакалаврскую работу, поступила в аспирантуру, окончила её. И с самых, с самого начала её прихода в лабораторию, она активно включилась в работу и занималась работами, связанными с формированием гидрогелей на основе хитозана. Её инициативность, её целеустремлённость, желание разобраться во всех проблемах позволила разработать под руководством Александра Анатольевича Вихрова такие универсальные, такой оригинальный метод формирования структурно-организованных хитозановых гидрогелей, которые даже не представлены в литературе, и соответственно продолжить дальше свою деятельность. И как бы большая заинтересованность в движении вперёд и познании всего нового как раз определило её второе направление работы, которая связана уже была с гиалуроновой кислотой. И благодаря её усилиям удалось создать такие композиции из гиалуроновой кислоты, которые легко настраиваются под любую технику лазерной технологии, в данном случае, фотоиндуцированной 3D фотопечати. И это позволяет использовать композиции, которые Настя готовит, которые изучала, во многих экспериментах, и потребность в них существует не только в нашей группе и также в других институтах. И это направление очень активно развивается в настоящее время. Ну, кроме того, Настя, следует отметить, что очень позитивный человек, очень дружелюбный человек, и благодаря этим качествам она смогла очень активно участвовать и сотрудничать с коллегами из целого ряда институтов. Поэтому я прошу членов учёного совета проголосовать за присуждение Насте степени кандидата наук.

Мирошников А.И., председатель:

Спасибо. Пожалуйста, Владимир Александрович.

Олейников В.А., ученый секретарь:

Так, ну я сразу хочу сказать, что работа выполнена в нашем институте. Соответственно, заключение от нашего института. Заключение, суть в том, что работа рекомендована. *(Зачитывает заключение организации, где выполнена диссертация).*

Ну начинается заключение, естественно, с биографических данных, о которых мы уже говорили. Важным является то, что вовремя утверждена на заседании учёного совета тема диссертации, это было ещё 27 мая 2021 года. Ну, далее посвящена актуальной теме эта работа, автор принимал активное участие практически на всех этапах исследования, от постановки задачи и проведения основных экспериментов до обработки, обсуждения, литературного оформления полученных результатов. Степень достоверности результатов не вызывает сомнений. Научная новизна работы состоит в разработке подходов к получению новых типов материалов с регулируемыми свойствами на основе двух полисахаридов. Практическая значимость исследования заключается в том, что полученные в ходе работы скаффолды на основе ковалентно и нековалентно сшитых гидрогелей из хитозана и модифицированной гиалуроновой кислоты имеют значительный потенциал для применения в тканевой инженерии. Ну и в конечном итоге работа рекомендована. Заключение принято на открытом заседании семинара отдела Биоматериалов и бионанотехнологий. Присутствовало 12 человек. Голосование – все “за”. Председателем семинара был Виталий Павлович Зубов. И заключение утверждено директором нашего института, Александром Габировичем Габировым, академиком РАН.

Теперь ведущая организация. *(Зачитывает отзыв ведущей организации).*

Ведущая организация — это Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева. Ну и, соответственно, отзыв положительный полностью. Естественно, начинается с позиции об актуальности данной работы. Пишется, что скаффолды на основе полисахаридов данных 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, однако разработка подходов к созданию трёхмерных изделий с контролируемыми химическими, физико-механическими свойствами, совместимыми с повреждёнными тканями, представляет собой первостепенное направление развития тканевой инженерии. И решению данной задачи посвящена представляемая работа. Изложена на 132 страницах, построение классическое. Обзор литературы рассмотрены в нём основные задачи современной регенеративной медицины, связанные с созданием тканеинженерных конструкций на основе гидрогелевых скаффолдов, которые в наибольшей степени подходят для включения клеток. Опять же, литературный обзор. Освещение широкого круга задач при получении гидрогелевых скаффолдов, представленное с использованием

современных литературных данных, позволили Сочилиной сформулировать цель, задачи диссертационной работы. Достоверность подтверждается использованием комплексных современных методов исследований. Результаты и обсуждение состоит из двух частей, вот эта часть, представляющих собой два различных подхода к получению новых гидрогелевых скаффолдов. Ну описывается первый метод и второй метод, то, что мы сегодня слышали. И научные результаты опубликованы в 12 статьях, представлены на 8 российских и международных конференциях. Далее научная новизна состоит в том, что 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. Практическая значимость работы заключается в потенциальной возможности применения разработанных методик формирования скаффолдов на основе хитозана и модифицированной гиалуроновой кислоты в медицинской сфере. Ну, и кроме всего прочего, недостатки. В целом диссертация Сочилиной производит положительное впечатление, однако имеются следующие замечания по диссертационной работе. Первое, в работе продемонстрирован направленный рост клеток в микроканалах хитозана на примере линии глиома С6, однако, желательно, было бы также провести аналогичные исследования на примере клеток нейронов или изучить эти скаффолды *in vivo*. Второе, 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 производными фталоцианина, что могло бы дополнить выводы о биосовместимости. Третье, в главе “Обзор литературы” некоторые разделы описаны достаточно подробно, как, например, подглавы, посвящённые природным полимерным 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. Ну, данные недостатки являются непринципиальными и не снижают общего впечатления от работы. Ну и, соответственно, рекомендация, что работа соответствует положениям о присуждении ученых степеней, автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности Биотехнология. Подписано, подготовил доцент доктор химических наук зав. кафедры биоматериалов РХТУ имени Менделеева Межуев. Ну и, соответственно, отзыв утверждён и.о. ректора Воротынцев.

Мирошников А.И., председатель:

Спасибо. Анастасия Владимировна.

Сочилина А.В., соискатель:

Благодарю за замечания от представителя ведущей организации.

По поводу первого вопроса касательно пожелания о том, чтобы провести исследования мультимедийных скаффолдов на примере уже клеток нейронов или изучения скаффолдов, таких скаффолдов *in vivo*. Да, спасибо за рекомендацию. Действительно, было бы хорошо провести такие испытания уже при имитации разрыва периферического нерва непосредственно в организме животного. Хотелось бы отметить, что в данной работе мы выбрали клеточную линию глиому С6 из доступных нам коллекций клеток, как наиболее близкую к нервным тканям, и всё.

По поводу второго вопроса о нехватке гистологических исследований скаффолдов на основе гиалуроновой кислоты с производным фталоцианина. Также хотелось бы отметить, что верно замечание. Было бы хорошо сделать гистологические исследования, провести дополнительные. Однако, также хочется отметить, что основной задачей при получении таких скаффолдов был всё-таки подбор условий их формирования. При этом мы ограничились данными о состоянии животных при внешнем наблюдении их вида и поведения.

По поводу третьего и четвёртого пункта, оформления обзора литературы и оформления текста более аккуратно – абсолютно правильное замечание, могу только с этим согласиться.

Мирошников А.И., председатель:

Спасибо. Ольга Евгеньевна, будьте добры.

Олейников В.А., ученый секретарь:

Сейчас, хочу два слова сказать. Поступили нам в диссертационный совет два отзыва на автореферат. Отзывы полностью положительные, без замечаний. Просто хочу сказать, что первый заведующий кафедрой химии и технологии высокомолекулярных соединений Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет», член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор Чвалун Сергей Николаевич, первый подписал. И второй отзыв тоже, это профессор центра фотоники и квантовых материалов Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий» доктор химических наук профессор Горин подписал отзыв на автореферат. Отзывы полностью положительные. Без замечаний.

Филиппова О.Е., оппонент: *(Излагает отзыв. Отзыв положительный).*

Добрый день, уважаемые коллеги. Если Вы позволите, я не буду зачитывать отзыв, а просто расскажу свои впечатления о работе. Работа очень объёмная. Она позволяет получать скаффолды, во-первых, из биосовместимых и биоразлагаемых полимеров. Во-вторых, разработаны два совершенно оригинальных способов получения этих скаффолдов, которые не имеют аналогов. Ну и в-третьих, те условия, в которых скаффолды получают, они позволяют широко варьировать свойства этих скаффолдов, достаточно легко. Таким образом, актуальность работы не вызывает никаких сомнений. По моему мнению работа может быть разделена на три части. В первой части получены скаффолды на основе нанофибриллярного хитозана. Надо сказать, что получение нанофибриллярного хитозана это вообще такое вот, как сказать, наиболее актуальное направление в исследовании хитозана последних лет, то есть как раз вот это и было использовано в настоящей работе. Такие скаффолды имеют свойства, имитирующие хрящевую ткань организма. Вторая часть работы посвящена также скаффолдам на основе хитозана, но в этом случае авторам удалось получить скаффолды с параллельно ориентированной системой каналов. Это совершенно оригинальная структура, которая позволяет, позволила бы получить направленный рост клеток, соответственно могла бы использоваться для регенерации разрывов кровеносных сосудов, нервов. Третья часть работы посвящена скаффолдам на основе гиалуроновой кислоты, модифицированной введением двойных связей. Это позволило получить уже химически сшитые скаффолды в отличие от предыдущих двух, которые были сшиты нековалентно. Очень важно отметить, что для этого химического сшивания были использованы достаточно нетоксичные фотоинициаторы, и второе, что важно, что для сшивания мог использоваться свет с длиной волны 670 нм, который попадает в окно прозрачности тканей, что позволяет получать эти скаффолды, так сказать, *in vivo*, подкожно. Как я говорила, работа очень объёмная, и мне кажется, каждая из этих трёх частей могла бы быть достаточно полноценной кандидатской диссертацией. То есть, в каждой части автор начинает использование оригинальных придуманных ею методик получения скаффолдов, шла через характеризацию этих скаффолдов и доходила до *in vivo* и *in vitro* исследований. Поскольку работа такая широкая, всё объять невозможно, и конечно она имеет ряд недостатков, в частности, они касаются вот характеристики скаффолдов, которые получены. Вот. Вот я позволю себе зачитать замечания в связи с этим. Значит, первое замечание. В работе предложен оригинальный способ получения нанофибриллярных гелей хитозана. Однако, структура этих гелей недостаточно исследована. Собственно, это замечание перекликается с вопросом, который был в ходе дискуссии. Значит, для характеристики структуры, в частности, использовали метод

сканирующей электронной микроскопии после лиофильного высушивания, то есть в условиях, не позволяющих сохранить нативную структуру набухших гелей. Можно было бы попробовать использовать метод крио-просвечивающей электронной микроскопии, он был бы более подходящим. Второе замечание. Перед исследованием гелеобразования хитозана в смеси воды и спирта, вот это первая часть работы, 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 уже работать, так сказать, осознанно в области полуразбавленных растворов с зацеплениями, а не подбирать концентрацию просто. Третье замечание. В работе проведены *in vivo* исследования хитозанового нанофибриллярного геля, ХТ-2/EtOH-47,5. Непонятно, не совсем понятно, чем обусловлен именно выбор данного геля для *in vivo* исследований? Четвёртое замечание. 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? И как экспериментально можно показать наличие указанных комплексов? Как бы, мне, например, кажется, что это как раз связано с микрофазным расслоением между поливиниловым спиртом и хитозаном, но это как бы требует изучения, этот вопрос. Ну и два таких формальных замечания. В таблице 3.3 приведены значения модуля Юнга с указанием ошибки измерений, например, 539 ± 54 . Поскольку ошибка 54 значит точнее, чем десятки мы не знаем, и надо было сказать бы, что это не 539, хотя бы 540. Вот, и последнее замечание. В работе используются некоторые некорректные термины, например, «желирование» вместо «гелеобразование», «набухаемость» вместо «набухание», «степень набухаемости» вместо «степени набухания» и «фотоинициация» вместо «фотоиницирование». Указанные недостатки не снижают ценность диссертационной работы, и она в целом производит благоприятное впечатление. Диссертационная работа Сочилиной Анастасии Владимировны соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней", а сама диссертантка заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 Биотехнология.

Мирошников А.И., председатель:

Спасибо. Анастасия Владимировна, давайте отвечайте. На четыре замечания.

Сочилина А.В., соискатель:

Благодарю Ольгу Евгеньевну за такой отзыв и за замечания.

По поводу первого замечания касательно недостаточности исследования структуры нанофибриллярных гелей и того, что лучше было бы исследовать их структуру методом криопросвечивающей электронной микроскопии. Да, действительно, данные крио-ТЭМ, криопросвечивающей электронной микроскопии, позволили бы точнее охарактеризовать структуру гидрогелей в их нативном состоянии. С этим поспорить невозможно. В данной работе мы выбрали самый такой распространённый, самый доступный метод лиофилизации гелей и исследование структуры методом сканирующей электронной микроскопии больше для исследования закономерностей влияния параметров гелеобразования на структуру. И это изменение можно наблюдать, даже вот используя менее совершенный метод, такой как лиофилизация и СЭМ.

Второй вопрос, перед исследованием гелеобразования следовало бы определить диапазоны концентраций полимера. Да, абсолютно правы. Действительно, ниже какой-то определённой концентрации полимера гель формироваться не будет. В данной работе мы использовали другой подход, мы брали концентрации заведомо высокие и постепенно их снижали, и изучали также зависимость этих свойств от концентрации. То есть, от обратного.

Третий вопрос, в работе проведены *in vivo* исследования хитозанового нанофибриллярного геля с содержанием хитозана 2% и этанола 47,5%. Чем обоснован выбор данного типа гидрогеля? Как известно цито- и тканесовместимость со скаффолдами зависят от множества факторов, и в том числе это механические свойства скаффолда. Мы выбрали вариант с самым высоким модулем Юнга, даже можно показать таблицу, вот он, который наибольшим образом отличается от механических свойств мягких тканей, в которые имплантировали, то есть, прогнозировалась наихудшая реакция организма на имплантацию такого скаффолда. И даже вот с таким неблагоприятным для организма образцом, биосовместимость была очень хорошая.

Четвёртый вопрос. Во второй части работы, по поводу комплексообразования хитозана и поливинилового спирта. Комплексы формируются за счёт водородных связей между гидроксильными группами поливинилового спирта и гидроксильными и аминогруппами хитозана. Эти данные мы брали из литературы, и там наличие комплексов доказывалось различными методами, в том числе изменение вязкости растворов в зависимости от содержания поливинилового спирта, и также существование комплексов доказывалось повышением константности кислотности хитозана при введении поливинилового спирта. По поводу пятого и шестого вопроса, то, что следовало бы округлить значения в таблице. Абсолютно верное замечание,

большое спасибо. И некорректное использование терминов. Также соглашусь, это мой недостаток, спасибо за замечание.

Мирошников А.И., председатель:

Спасибо. Спасибо. Тимофей Евгеньевич, пожалуйста.

Григорьев Т.Е., оппонент: *(Излагает отзыв. Отзыв положительный).*

Уважаемые коллеги, добрый день. Я полностью соглашусь с Ольгой Евгеньевной. Работа очень обширная, очень, очень много сделано, но на самом деле вот опять же в защиту диссертантки скажу, что, наверное, если мы посмотрим на специальность “Биотехнология”, то все вопросы уводят нас в сторону высокомолекулярных соединений. Вот если уже расковыривать до конца те находки, которые были применены в этой работе, потому что действительно очень интересные методики, и, соответственно, Анастасии Владимировне удалось пройти в первой части исследования фибриллярными гелями, пройти как-то между классическими методиками криогелирования и таких вот методик гель-сублимационных, или просто лиофилизационных, и получить интересные структуры, это действительно очень здорово. Соответственно, во второй части работы, вот на втором объекте, создание вот этих направленных пор как раз тоже можно достигать разными методами, и вот я с удивлением увидел ещё один интересный метод такой вот градиента осаждения хитозана совместно с поливиниловым спиртом. Очень интересный метод, который позволяет это получать без дополнительных реагентов, сшивок и так далее. И соответственно, дальше идёт такая уже классическая, но от этого не менее ценная работа по фотосшивке гиалуроновой кислоты с применением новых интересных фотосшивателей, опять же, ну естественно, как это принято в данной области, в окне прозрачности биологических тканей. И вот в целом мне очень понравилась работа, как раз вот, наверное, именно по биотехнологии балансом фундаментальных подходов химии и физики полимеров и уже достаточно обширным выходом в прикладную область вот этих вот работ. Потому что результаты получены очень интересные, и конечно много было можно написать пожеланий и с нейрональными клетками, и имплантации больше, да, и гистология после имплантации, вот всё, что прозвучало, но это уже действительно наверное работу расширяет и, наверное, сгенерирует ещё одну, две, а то и три кандидатские диссертации, если в них как следует в этих вопросах разбираться. Так, соответственно для порядка я замечания зачитаю. Работа очень хорошая, но, естественно, можно всегда найти замечания. Первое, 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. Ну, собственно говоря, этот вопрос уже обсуждался, я здесь полностью согласен с тем, что можно так делать при некоторых случаях, но обязательно надо обсуждать, как эта лиофилизация влияет на структуру, и чтоб мы понимали, что привнесли лиофилизацией, а что, соответственно, является свойством нашей системы. Второе. 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. Третье. 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 трёхмерной печати для этой системы. Четвёртое. При исследовании взаимодействия клеток с полученными материалами следует отдельно описать планируемые способы применения материалов в тканевой инженерии в области пористости и миграции клеток в объём материала. В некоторых случаях пористость разработанных гидрогелей недостаточна для активного проникновения клеток в объём материала. Тем не менее, указанные недостатки не снижают благоприятного впечатления от работы, и диссертационная работа Сочилиной Анастасии Владимировны соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней", а сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 Биотехнология. Спасибо за внимание.

Миροшников А.И., председатель:

Спасибо. Ну что, Настя, отвечайте.

Сочилина А.В., соискатель:

Благодарю Тимофея Евгеньевича за отзыв и за замечания.

Первое замечания. По поводу исследования структуры методом СЭМ с сопутствующей лиофилизацией и влияние этого процесса и заморозки на структуру. Это очень популярный вопрос, вот, по поводу моей диссертации. Хотелось бы ещё раз подчеркнуть, что для заморозки мы использовали жидкий азот, для проведения шоковой заморозки и исключения формирования кристаллов льда. То есть, в данном случае, именно сам процесс заморозки, как мы предполагаем, оказывал минимальное влияние, но лиофилизация, да, к сожалению, скорее всего приводила к некоторому

уменьшению диаметров пор по сравнению с нативной структурой. И хочется ещё раз подчеркнуть, что конечно же было бы очень интересно исследовать нативную структуру, но в первую очередь в данной работе мы заострили своё внимание на изучение закономерностей изменения морфологии в зависимости от различных параметров.

Второй вопрос, про исследование физико-механических свойств при комнатной температуре, и о том, что желательно проводить такие исследования при температуре 37°C и в фосфатном буфере. Абсолютно правы, это очень ценное замечание, и в будущем мы хотели бы провести такие исследования.

Третий вопрос. при исследовании реологических свойств растворов и композиций гиалуроновой кислоты необходимо исследовать не только кинематическую вязкость, но и получать кривые течения, что позволит подобрать правильные параметры 3D печати. Также абсолютно правы, Вы правы, но тут мы применили иной подход. Мы подбирали условия печати индивидуально для каждого прибора, поскольку принтеры, на которых мы печатали, они были собраны вручную в институте “Кристаллография и фотоника”, и для них не были прописаны вот эти вот параметры печати в виде кривых течения. Поэтому тут только подбор условий именно вручную можно было проводить.

Четвёртое замечание. При исследовании взаимодействия клеток с полученными материалами следует отдельно описать способы применения материалов в тканевой инженерии в области пористости и миграции; некоторых случаях пористость гидрогелей недостаточна для активного проникновения клеток. Абсолютно правы. Особенно это касается нанофибриллярных гелей хитозана. Хочу отметить, что в случае данного вида гелей их, способ их получения разрабатывался под конкретную, ну, по направлению к имитации хрящевой ткани, которая обладает плотной структурой с очень малым количеством клеток. Поэтому в данном случае, возможно, пористость будет играть не такую большую роль. Кроме того, для создания пористости у данного вида материала есть различные подходы, в случае молдинга это жертвенные структуры, или вот 3D печать тех же решётчатых структур с регулируемым диаметром пор. Вот. Спасибо большое.

Мирошников А.И., председатель:

Так, спасибо. Ну, следующий вопрос у нас — это дискуссия. Желаящие выступить? Николай Владимирович, давайте.

Бовин Н.В.:

Сразу и в первую очередь хочу сказать, что я поддерживаю эту работу и считаю, что работа полностью соответствует всем критериям, диссертант заслуживает присуждения

искомой степени. Здесь ни у меня нет сомнений, ну и я думаю, что и у большинства или у всех присутствующих тоже. Но тем не менее я хотел бы высказать некое соображение общего характера, согласитесь вы, не согласитесь – не предскажу, но высказаться всё-таки хочется. Я полагаю, что нужно ввести такое понятие, как “научный эгоизм”. Те исследования, которые ведутся в фундаментальных областях, ну соответственно кончаются диссертациями в области биоорганической химии, биохимии, молекулярной биологии, сами исследования и исследователи могут и обязаны позволить себе вот этот самый научный эгоизм, то есть, что хочу, то и изучаю, нравится это, я это изучаю. Но когда речь идёт об области биотехнологии, соответственно, защите диссертации на соискание у биотехнологии, то вот этот научный эгоизм здесь, ну, не то, чтобы недопустим, но нежелателен, потому что технологические исследования, они должны быть ориентированы на практическое применение. Соответственно, здесь должна либо быть конкретная задача, например, надо создать искусственное ухо, и исследования делаются так, чтобы создать в конце этой работы искусственное ухо. Или должна быть сформулирована конкретная биотехнологическая задача общего характера. Ну, например, надо создать биodeградируемый кардио-стент, и уже какими способами Вы эту общую кардинальную проблему биотехнологий, медицинских биотехнологий решаете это уже Ваши проблемы, это уже Ваш выбор. А в данном случае получилось, что биотехнологическая задача решается с помощью вот этого подхода научного эгоизма: я хочу посмотреть, как материал на основе поливинилового спирта, на основе хитозана, на основе гиалуроновой кислоты, как из них можно было получить достойные материалы, интересные для всей биотехнологии медицинской в целом, для получения искусственных органов и тканей. Но никак не связано это с конкретной задачей или с решением конкретной общей биотехнологической проблемой. У меня пожелание, не знаю, поддержите ли вы меня или нет, на будущее, чтобы всё-таки этот научный эгоизм не использовался, не практиковался в исследованиях по биотехнологии.

Мирошников А.И., председатель:

Спасибо. Настя, давайте, заключительное слово.

Олейников В.А., ученый секретарь:

Ещё Виталий Павлович бы хотел.

Мирошников А.И., председатель:

А, ещё Вы хотели?

Зубов В.П.:

Да. Можно?

Мирошников А.И., председатель:

Ну давай.

Зубов В.П.:

Ну, я поскольку участвовал в обсуждении этой работы, как уже говорил Владимир Александрович, на семинаре позволю себе несколько слов сказать о работе и несколько слов о диссертанте. О работе можно что сказать, что вот это пример партнёрства физико-химической биологии с науками о материалах. Ну, собственно, как и первая работа – это партнёрство биологии с органической химией. Без материалов не может существовать ни одна современная отрасль, поэтому те материалы, которые предлагаются смежными областями, они обогащают и помогают развитию соответствующей области физико-химической биологии и биотехнологии, вот. И действительно, как мне кажется, Насте удалось сделать несколько интересных предложений, продемонстрировать. Ну, конечно, доведение каждого из них до реального уха, или до реального сосуда это дело серьёзное. Но, в частности, материалы с направленными цилиндрическими порами, они могут уже испытаны быть и, наверное, уже будут испытаны как имплантаты для восстановления нервной ткани, поскольку там нервные клетки прорастают сквозь них и как раз моделируют те природные скаффолды, которые в этом участвуют. Вот, теперь несколько слов о соискателе. Ну Настя пришла к нам как студентка биологического факультета, то есть она по образованию биолог, но увлеклась химическими задачами и, не потеряв свою биологическую закалку стала высококвалифицированным химиком, материаловедом. То есть, с точки зрения квалификации это очень ценный перспективный кадр. А ещё она очень инициативный человек, потому что значительная часть материала, о которой Настя сегодня докладывала, это её инициативные исследования, которые она развивала параллельно с той темой, которую ей дала руководитель. Мне кажется, что всё это в целом позволяет поддержать эту работу, и я призываю членов диссертационного совета проголосовать “за”. Спасибо.

Мирошников А.И., председатель:

Постараемся. Так, Настя, давайте.

Сочилина А.В., соискатель:

Прежде всего, хочу поблагодарить всех присутствующих за то, что выслушали мою диссертацию и внесли замечания по этой работе. Я хочу согласиться с тем, что действительно в большинстве случаев всё-таки следует брать задачу из медицины и отталкиваться от неё, то есть делать всю работу вокруг этой задачи. Однако, есть и другой подход, это создание пула материалов и потом может быть выбор какого-то

одного типа материалов и уже более его углублённое изучение. Я считаю, что оба подхода должны существовать, и в дальнейшем будет проведено больше исследований уже для создания именно каких-то конкретных тех же имплантов или скаффолдов для замещения конкретных органов или тканей. Большое спасибо за замечание. Также хочу выразить свою благодарность всем людям, которые помогали мне в моём жизненном пути и при создании данной диссертации. В частности, хочу поблагодарить Аллу Николаевну Генералову за руководство и направление моих исследований и Вихрова Александра Анатольевича за очень такую плодотворную работу с хитозановыми гидрогелями, Дёмину Полину за постоянное присутствие рядом и поддержку безусловную, как советами, так и горячим чаем. Хочу выразить благодарность коллегам из Института биоорганической химии за помощь в исследованиях, за советы, за предоставление возможности поработать за приборами или за предоставление клеточных линий или животных. Также выражаю благодарность коллегам из Федерального Научно-Исследовательского Центра “Кристаллография и Фотоника”, в частности это Хайдуков Евгений Валерьевич, который также принимал участие в руководстве исследований по части исследований гиалуроновой кислоты и помогал как ресурсами, так и советами. Это Савельев Александр Георгиевич, коллега, с которым мы сделали очень много экспериментов по созданию скаффолдов на основе гиалуроновой кислоты. И другие коллеги, которые также помогали как в области изучения структуры, так и советами и просто поддержкой, и так далее. Хочу поблагодарить коллег из Института физической химии и электрохимии имени Фрумкина за работу с мультимедийными гидрогелями из хитозана. Отдельная благодарность Шолиной Наталье Валерьевне за проведение множества экспериментов с животными, без неё как бы было бы совсем грустно. Также хочу поблагодарить коллег из Сколковского института науки и технологии и из Нижегородского университета имени Лобачевского за эксперименты в области биовизуализации скаффолда и за *in vivo* эксперименты с мозговой тканью мышей. Ещё хочу сказать благодарность Акасову Роману также за многочисленные *in vitro* испытания наших гидрогелевых скаффолдов. Спасибо моим родителям и моим друзьям также за тёплую поддержку и боление за меня. Вот. Если я кого-то забыла, то не сердчайте, я не специально. Вот, очень всех благодарю.

(Проходит обсуждение проекта заключения совета. Бовин Н.В. предлагает внести небольшие поправки в формулировки в раздел о практическом значении работы)

Мирошников А.И., председатель:

Коллеги, проголосуем «за»? Давайте проголосуем. *(Проект заключения совета принимается единогласно.)*

Мирошников А.И., председатель:

Спасибо. Так, коллеги, тайное голосование сейчас. Счётная комиссия, прошу.

(Идёт тайное голосование)

Олейников В.А., учёный секретарь:

Значит, счётная комиссия завершила свою работу. По диссертации Сочилиной Анастасии Владимировны. Присутствовало 23 члена диссертационного совета, роздано бюллетеней – 23, оказалось в урне бюллетеней – 23, за – 23, против и недействительных нет.

Мирошников А.И., председатель:

Ну что – утверждаем?

Олейников В.А., ученый секретарь:

Утвердите.

Мирошников А.И., председатель:

Кто «за»? Против есть? Воздержавшихся нет. Большое спасибо. Заседание окончено.

Олейников В.А., ученый секретарь:

Поздравим наших диссертантов.

Мирошников А.И., председатель:

Спасибо.

Председатель
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Мирошников А.И.

Учёный секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

