

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Сочиловой 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

В современной медицине одним из наиболее перспективных направлений, связанных с регенерацией повреждённых участков тканей и органов, является тканевая инженерия. Она основана на имплантации в организм тканеинженерных конструкций, которые представляют собой сочетание имитирующих место повреждения полимерных структур, также известных как скаффолды, и клеток, отвечающих за регенерацию ткани. Возможность формирования скаффолдов *de novo* является важным преимуществом перед традиционной трансплантацией донорских органов, поскольку позволяет избежать длительного и трудоемкого поиска подходящего донора, при этом риск отторжения вследствие иммунологической несовместимости отсутствует. Однако, несмотря на значительный прогресс, в тканевой инженерии существуют проблемы, ограничивающие её применение в медицине, например, неудовлетворительные биосовместимость и биодеградация скаффолдов, несоответствие свойств материалов свойствам тканей организма, слишком сложные и дорогостоящие процедуры изготовления скаффолдов, производство которых не окупается, и многие другие. В настоящее время одной из главных задач тканевой инженерии является подбор материалов и способов формирования скаффолдов, которые позволяют создавать биосовместимые апирогенные конструкции, не проявляющие иммуногенность и цитотоксический эффект, с оптимально подобранными механическими свойствами и временем жизни в организме, а также имеющие высокую

адгезию к клеткам. Одними из наиболее перспективных материалов являются полимеры природного происхождения - полисахариды.

Диссертационная работа Сочилиной А.В. посвящена решению данной проблемы, что определяет актуальность темы исследования, а выбор цели и задач - обоснованным. Работа представляет собой разработку методов формирования и исследование свойств скаффолдов на основе выбранных диссертанткой двух полисахаридов природного происхождения: хитозана и гиалуроновой кислоты. В работе рассматриваются новые методы формирования скаффолдов на основе хитозана с использованием нековалентных взаимодействий и на основе гиалуроновой кислоты, модифицированной глицидилметакрилатом, с использованием ковалентного сшивания, индуцированного лазерным излучением. Такой подход позволяет получать структурно-организованные скаффолды с широким набором свойств. Разработанные методы без сомнения являются ценным вкладом в технологию тканевой инженерии.

Диссертационная работа изложена на 132 страницах, содержит 39 рисунков, 17 схем и 4 таблицы, обладает классической структурой: состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающей 178 наименований. Основное содержание диссертации отражено в автореферате.

Полученные автором основные результаты, обладающие научной новизной и практической значимостью, состоят в следующем:

- Продемонстрирована возможность получения нековалентно сшитых гелей и гидрогелей с нанопибриллярной структурой и высоким модулем упругости при охлаждении водно-спиртовых растворов хитозана при температурах выше их точки замерзания. Двухстадийность разработанной методики позволяет не только хорошо адаптировать её под современные технологии формования и 3D печати изделий, но и

эффективно регулировать их свойства, настраивая под свойства замещаемых тканей организма.

- Установлено, что формирование нековалентно сшитых гидрогелей с системой параллельно ориентированных каналов происходит в условиях фронтального гелеобразования смесей хитозана с поливиниловым спиртом с использованием щелочи в качестве осадителя. Полученные каналные гидрогели не цитотоксичны и способны обеспечивать направленный рост клеток внутри каналов, что было показано на примере клеточной линии глиомы С6. Направленный рост клеток вдоль одного направления может играть важную роль при регенерации разрывов периферических нервов или кровеносных сосудов.
- Для определения количества двойных связей в составе гиалуроновой кислоты, модифицированной глицидилметакрилатом, был разработан экспресс-метод на основе реакции с перманганатом калия со спектрофотометрическим подтверждением результатов. Этот метод позволяет быстро проводить количественный анализ степени замещения получаемых производных группами с двойной связью для последующего изучения влияния этого параметра на свойства скаффолдов.
- Продемонстрировано влияние степени замещения на свойства скаффолдов из модифицированной гиалуроновой кислоты, что может послужить эффективным инструментом настройки их свойств под различные виды тканей организма. Также проведён анализ условий реакции для контролируемого получения требуемой степени замещения.
- Установлено, что фотоиндуцируемая реакция сшивания модифицированной гиалуроновой кислоты в присутствии эндогенного соединения флавиномононуклеотида (витамина В2) в качестве фотоинициатора позволяет получать биосовместимые скаффолды различной архитектуры как формированием, так и экструзионной 3D печатью. Кроме того, был разработан новый подход для получения полых трубчатых

конструкций модификацией метода экструзионной 3D печати, в ходе которого стенки конструкции формируются в условиях диффузии фотоинициатора из раствора. Также на примере клеточной линии HaCaT была продемонстрирована возможность формирования скаффолдов с инкорпорированными в них живыми клетками.

- Установлено, что фотоиндуцируемая реакция сшивки модифицированной гиалуроновой кислоты в присутствии водорастворимого производного фталоцианина позволяет формировать биосовместимые скаффолды непосредственно в организме (подкожно) под действием света (670 нм), попадающего в «окно прозрачности» тканей организма, то есть диапазон длин волн, способных проходить сквозь ткани.

Данная диссертационная работа отличается разносторонностью задач и подходов к их решению, а также широким набором методов исследования с подтверждением применимости полученных изделий для имплантации посредством *in vitro* и *in vivo* испытаний. Разработанные методики формирования скаффолдов представляют не только практическую значимость своей простотой и доступностью материалов, но и научно-исследовательскую значимость, в частности, немалый интерес вызывают механизмы гелеобразования нанопибриллярных гелей и гидрогелей с системой направленных каналов на основе хитозана. В целом, достоверность и новизна полученных автором результатов сомнений не вызывают, однако есть несколько замечаний и комментариев к диссертационной работе.

1. В работе предложен оригинальный способ получения нанопибриллярных 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 нанофибрилярного 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 «фотоинициирование».

Указанные недостатки не снижают ценность диссертационной работы, и в целом она производит благоприятное впечатление.

Диссертационная работа Сочилиной Анастасии Владимировны 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 сама диссертантка заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 - Биотехнология.

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»,

Филиппова

Филиппова О.Е.

Адрес: 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, корп.2

Тел.: +7(495)939-1464

E-mail: phil@polly.phys.msu.ru

« 20 » 09 _____ 2022 г.

Подпись д.ф.-м.н. Филипповой О.Е. удостоверяю

Декан физического факультета

МГУ им. М. В. Ломоносова,

доктор физико-математических наук,

профессор

