

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 99.0.027.03,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ РОССИЙСКОГО ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА ИМЕНИ Д.И. МЕНДЕЛЕЕВА МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ТВЕРСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ИНСТИТУТА БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ ИМЕНИ
Н.М. ЭМАНУЭЛЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК,
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело

№ _____

решение диссертационного совета
от «24» декабря 2024 года № 20

О присуждении Мыльниковой Алёне Николаевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата технических наук.

Диссертация «Разработка микрофлюидной модели кровеносного сосуда для изучения функциональных свойств эндотелиальных клеток» по специальности 1.5.6. Биотехнология принята к защите «22» октября 2024 года (протокол заседания № 17) диссертационным советом 99.0.027.03, созданным на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной технической университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (125047 Москва, Миусская площадь д. 9, приказ о создании диссертационного совета от «28» сентября 2016 года № 1172/нк).

Соискатель Мыльникова Алёна Николаевна 28 ноября 1991 года рождения, в 2015 году окончила Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева. В 2019 году освоила программу подготовки научных и научно-педагогических кадров в аспирантуре Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева.

С 2017 по 2022 год работала в должности ассистента, с 2022 года по настоящее время работает в должности старшего преподавателя на кафедре химии и технологии биомедицинских препаратов Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. С 2018 по 2023 год работала в должности младшего научного сотрудника лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии наук.

Диссертация выполнена на кафедре химии и технологии биомедицинских препаратов Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и в лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии Российской академии наук.

Научный руководитель – кандидат медицинских наук Московцев Алексей Александрович, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного стресса, руководитель Центра коллективного пользования Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Смирнов Иван Витальевич, доктор химических наук, член-корреспондент Российской академии наук, заместитель директора по науке, главный научный сотрудник лаборатории химии протеолитических ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук;

Акатов Владимир Семёнович, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий лабораторией тканевой инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства» (Москва) в своем **положительном** отзыве, подписанном Басмановым Дмитрием Викторовичем, руководителем центра Микротехнологии и микрофабрикации, указала, что диссертационная работа Мыльниковой А.Н. является самостоятельной научно-квалификационной работой, посвященной разработке кровеносного сосуда-на-чипе, и по научной новизне, актуальности, объему и обоснованности научных результатов соответствует требованиям пп. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утв. постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 в действующей редакции). Ее автор – Мыльникова Алёна Николаевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология (отзыв заслушан и одобрен на расширенном семинаре Центра микротехнологии и микрофабрикации и Центра молекулярной медицины Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства «24» октября 2024 года и утвержден протоколом от «25» октября 2024 года № 2).

Соискатель имеет 16 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 16 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 4 работы. Общий объем диссертации составляет 143 страницы. **В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах.** Все работы опубликованы в соавторстве, личный вклад автора составляет более 70% и состоит в анализе литературных данных, формулировке и обсуждении задач, решаемых в квалификационной работе, подготовке и проведении экспериментов, интерпретации полученных результатов и их обобщении, формулировке основных научных выводов, а также в написании научных публикаций и представлении докладов на конференциях. Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на 4 международных и всероссийских научных конференциях и форумах; получен один патент РФ; монографий и депонированных рукописей соискатель не имеет.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Мыльникова А.Н., Ощепков М.С., Соловьева И.Н., Московцев А.А., Колесов Д.В. Применение микрофлюидных технологий в современной биотехнологии // Химическая промышленность сегодня. 2023. № 6. С. 2-8 (CAS)

2. Коваленко Л.В., Ощепков М.С., Мыльникова А.Н., Меньков А.О., Удовенко В.А., Семчукова М.И., Соловьева И.Н. Конструкционные особенности микрофлюидных устройств и области их применения // Бутлеровские сообщения. 2018. № 9(55). С. 91-105 (ВАК)

3. Московцев А.А., Колесов Д.В., Мыльникова А.Н., Зайченко Д.М., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Ответы эндотелиальных клеток на деформацию сдвига: механотрансдукция, клеточный стресс и адаптация // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2017. Т. 61, № 4. С. 112-125 (CAS)

На диссертацию и автореферат поступило 5 отзывов, **все положительные**. В отзывах указывается, что представленная к защите диссертационная работа характеризуется высокой

актуальностью, научной ценностью и имеет большое значение для теории и практики экономического развития Российской Федерации. Отзывы направили:

1) Понаморёва Ольга Николаевна, доктор химических наук, заведующий кафедрой биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Тверской государственной технической университет». В качестве замечания в отзыве отмечено, что некоторые рисунки недостаточно читаемы (например, 3,7, 7-9) и в заключении автор не подчеркнул, достигнуты ли поставленные задачи.

2) Прохорова Марина Владимировна, кандидат биологических наук, специалист направления клеточный и белковый анализ общества с ограниченной ответственностью «ДиаЭм». В отзыве отмечено, что в автореферате не указана степень разработанности научной проблемы и преимущества/недостатки разработанной модели по сравнению с описанными в научной и патентной литературе.

3) Гурина Ольга Ивановна, доктор медицинских наук, профессор Российской академии наук, член-корреспондент Российской академии наук, руководитель лаборатории нейробиологии отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Замечания отсутствуют.

4) Липкин Алексей Валерьевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Замечания отсутствуют.

5) Скиба Екатерина Анатольевна, доктор технических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биоконверсии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук. В отзыве имеются вопросы: (1) каким образом была выбрана скорость потока в динамических условиях 400 мкл/мин (с. 12) и какая скорость является предельной? (2) автором показано, что сдвиговая деформация, создаваемая потоком, приводит к повреждению клеточной мембраны эндотелиальных клеток. Оценивалась ли летальность культуры?

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что они являются признанными специалистами в данной области биотехнологии, что подтверждается наличием значительного числа научных публикаций в области исследования защищаемой диссертации, а также спецификой и профилем диссертационной работы, и выполнен в соответствии с пп. 22 и 24 «Положения о присуждении ученых степеней» (постановление Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 в действующей редакции).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- разработана микрофлюидная модель кровеносного сосуда с применением клеточной линии EA.hy926

- предложен подход к проектированию микрофлюидной модели для имитации участка кровеносного сосуда;

- доказана работоспособность спроектированной модели, заключающаяся в стойком поддержании жизнеспособности клеточной культуры в течение длительного времени в условиях стендовой системы, что требует оптимизации протокола культивирования клеток в данном формате по сравнению с традиционными методами.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано влияние сдвиговой деформации на выживаемость, степень адгезии, проницаемость клеточных мембран, продукция монооксида азота (NO) и изменение уровня экспрессии белковых факторов, вовлеченных в ответ на стрессовое воздействие на эндотелиальные клетки, **раскрыты** принципиальные отличия в поведении клеток в статических условиях и условиях сдвиговой деформации;

использованы современные компьютерные программы и физико-химические методики: микроскопия в проходящем свете, оптическая конфокальная микроскопия, зондовая ион-проводящая микроскопия, электронная сканирующая и флуоресцентная микроскопия, спектрофлуориметрия. Оценку содержания и распределения исследуемых белковых маркеров в клетках проводили методом иммуноферментного анализа.

изложены основные этапы создания микрофлюидной модели: проектирование, выбор материалов, изготовление, сборка стендовой микрофлюидной системы, тестирование работоспособности модели, **проведена модернизация** конструкции микрофлюидной модели кровеносного сосуда и протокола культивирования клеток в микроканале, **предложена** биологическая модель кровеносного сосуда, не имеющая описанных в специальной литературе и запатентованных аналогов.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

Проведенные исследования по оптимизации геометрии устройства, критический выбор подложек и полимерной основы, метода модификации поверхности микрофлюидного устройства и оптимизированный протокол культивирования клеток в микроканале могут быть учтены и использованы при проектировании других микрофлюидных моделей органов и тканей на чипе.

Созданная микрофлюидная модель эндотелиальной выстилки кровеносного сосуда может быть использована для изучения влияния гидродинамического режима, создаваемого током крови по сосудам, на основные параметры жизнедеятельности эндотелиальных клеток, таких как выживаемость, степень адгезии, проницаемость клеточных мембран, продукция монооксида азота (NO) и изменение уровня экспрессии белковых факторов, вовлеченных в ответ на стрессовое воздействие на клетку, что позволяет использовать эту модель для изучения регуляции клеточного гомеостаза в условиях потока.

Доказан широкий потенциал для научного и практического применения разработанной модели, в том числе в клинических испытаниях доставки лекарственных веществ в клетку и биосовместимости сосудистых имплантов

Выработаны методологические подходы по проверке работоспособности модели (методические рекомендации, рекомендации для более высокого уровня деятельности, предложения по дальнейшему совершенствованию).

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

- результаты получены на сертифицированном оборудовании, обоснованы калибровки, показана воспроизводимость результатов исследования в различных условиях;

- теория, построенная на известных проверяемых данных, фактах, в т.ч. для предельных случаев, согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

- достоверность полученных результатов обеспечена использованием методик эксперимента, соответствующих современному научному уровню, и подтверждена их согласованностью:

- выводы диссертации обоснованы и не вызывают сомнения и согласуются с современными представлениями к выбору объектов и методов.

Личный вклад соискателя состоит в анализе литературных данных, постановке, решении и обсуждении задач, решаемых в диссертационной работе, создании экспериментальных стендов и установок, подготовке и проведении экспериментов, интерпретации полученных результатов и их обобщении, формулировке основных научных выводов, а также в написании научных публикаций и представлении докладов на конференциях.

В ходе защиты диссертации были высказаны **следующие вопросы**.

1. Каков личный вклад автора в этой работе?
2. Насколько адекватны представленные расчеты с учетом того, что кровь не относится к ньютоновским жидкостям?
3. Насколько адекватно и необходимо использовать микрореакторы в данном случае, когда лимитирующая стадия – это не внешняя диффузия, а транспорт между клеточными мембранами?

4. Разработанное устройство позиционируется как устройство для культивирования клеток или как модель кровеносного сосуда?
5. Вопрос по конструкции устройства: что нового было предложено? Бифуркация и замкнутая система предложены автором впервые?
6. На чем был основан выбор белкового покрытия для подложки?
7. Коллаген I типа при температуре 37 °C со временем будет превращаться в желатин. Не будут ли живые клетки вырабатывать деструкторы, открепляться от поверхности и улетать? Не будет ли при этом наблюдаться гибель клеток?
8. Для чего использовалась добавка азота при изучении эндотелиальной NO-синтазы (eNOS)?
9. Используемая при создании модели клеточная линия является стандартной или была специально разработана автором?
10. Как было доказано, что течение в канале ламинарное? Чему равнялись вязкость и плотность моделируемой жидкости?
11. Каково происхождение клеточной линии, используемой в работе?
12. В чем состоит научная новизна работы?

Соискатель Алёна Николаевна Мыльникова ответила на заданные ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию.

По первому вопросу автор уточнила, что вся экспериментальная часть, включающая сборку устройства и работа с клеточными линиями, была полностью выполнена ей лично, кроме части, касающейся расчета гидродинамических параметров и проектирования конечной геометрии устройства, которые были выполнены совместно с коллегами.

По второму вопросу автор пояснила, что наблюдаемые в канале эффекты зависят от того, к макрососудистой или микрососудистой системе относится моделируемый участок. При переходе к более крупным сосудам жидкости начинают вести себя как ньютоновские, поэтому представленные расчеты соответствуют тому, что действительно протекает в сосудах сопоставимого диаметра.

По третьему вопросу автор ответила, что в связи с тем, что в нормальных условиях клетки растут при постоянном механическом воздействии потока жидкости, этот фактор необходимо учитывать при культивировании, в то время как стандартные методики его не учитывают. Представленные результаты продемонстрировали, что имеется достоверное отличие в поведении клеток при наличии в системе потока.

По четвертому вопросу автор уточнила, что спроектированная модель является моделью кровеносного сосуда и не предназначена для использования для наращивания биомассы, при том, что подобные системы также могут быть созданы в микрофлюидном формате.

По пятому вопросу автор пояснила, что было предложено несколько вариантов конструкций, включающих сложную геометрию камер, симметричные и ассиметричные бифуркации в каналах. Все это было необходимо для создания сложных профилей потока с участками, где наблюдались различные значения сдвигового напряжения. Кроме того, была предложена замкнутая система, дающая возможность проводить длительные эксперименты и минимизировать проблемы, возникающие при культивировании в потоке (микробная контаминация, образование в системе пузырей воздуха, большой расход питательной среды).

По шестому вопросу автор ответила, что выбор белкового покрытия был основан на результатах анализа литературных данных. Выбранный тип коллагена наиболее совместим с используемой в работе клеточной линией.

По седьмому вопросу автор пояснила, что для адгезионной культуры характерно открепление от поверхности при потере жизнеспособности, но на тех временных интервалах, в которых проводили эксперименты, такой эффект отмечен не был. Кроме того, клетки EA.Hy926 адгезируют и к необработанной поверхности PDMS, поэтому даже когда коллагена станет меньше, они все равно будут иметь точки связывания с поверхностью.

По восьмому вопросу автор уточнила, что L-аргинин вводили в среду в силу того, что клеткам был необходим дополнительный источник азота, чтобы было из чего синтезировать NO, продукция которого предположительно должна была повышаться при действии потока.

По девятому вопросу автор пояснила, что в работе использовалась гибридная клеточная линия EA.Hy926, полученная путем гибридизации первичной эндотелиальной клеточной линии HUVES с клеточной линией аденокарциномы легкого A-549. Используемая клеточная линия по выживаемости, скорости пролиферации и удобстве работы с ней лучше, чем чаще всего применяемая в подобных моделях линия HUVES.

По десятому вопросу автор ответила, что на представленных в презентации и в диссертации изображениях показано, что минимальная скорость наблюдается у стенок канала с постепенным увеличением скорости к центру, что указывает на параболический профиль распределения скоростей потока, соответствующий ламинарному режиму течения жидкости. Кроме того, из расчетов числа Рейнольдса для канала соответствующего сечения и выбранной скорости потока также следует, что в канале должен устанавливаться ламинарный режим. При проектировании в качестве модельной жидкости была выбрана вода с ее параметрами вязкости и плотности.

По одиннадцатому вопросу автор уточнила, что клеточная линия EA.Hy926 была подарена лаборатории Университетом Северной Каролины США.

По двенадцатому вопросу автор пояснила, что, во-первых, спроектирована микрофлюидная модель кровеносного сосуда, оптимизирован протокол культивирования и материалы именно для клеточной линии EA.Hy926, на которой ранее такие исследования не проводились. Во-вторых, колокализация GRP78 и фактора Виллибранда и некоторые аспекты именно его экспрессии в потоке в микроканале тоже ранее не изучались, как и продукция NO из-за сложности в его определении.

На заседании «24» декабря 2024 года диссертационный совет принял решение за новые научно обоснованные технические и технологические решения и разработки по созданию клеточно-тканевой модели кровеносного сосуда человека с применением микрофлюидной технологии, имеющие существенное значение для развития ангиологии, сосудистой хирургии и фармацевтической промышленности страны, присудить Мыльниковой Алёне Николаевне ученую степень кандидата технических наук.

Диссертация соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в действующей редакции). По своему содержанию диссертация отвечает паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология (технические науки) по направлениям исследования 3. «Изучение и разработка технологических режимов выращивания культур тканей и клеток растений и животных для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений и других продуктов, изучение их состава и методов анализа, технико-экономических критериев оценки, создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения», 6. «Разработка принципов и алгоритмов для проектирования и создания оптимальных компьютеризированных систем управления биотехнологическими процессами» и 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».

Полученные в диссертации А.Н. Мыльниковой научные результаты и выводы могут быть рекомендованы для ознакомления и внедрения в образовательных и научных организациях, где ведутся исследования и разработки в области создания клеточных моделей тканей и органов, целостных организмов (Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Федеральное медико-биологическое агентство России, Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, МИРЭА – Российский технологический университет и др.).

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 18 докторов наук по научной специальности 1.5.6. Биотехнология, участвовавших в заседании,

из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 19 (девятнадцать), против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета

Виктор Иванович Панфилов

Ученый секретарь диссертационного совета

Ирина Васильевна Шакир

24.12.2024

