

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА
24.1.232.01 (Д 002.285.01), СОЗДАННОГО НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ПУЩИНСКИЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ
НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета

от 20 июня 2024 г. № 86

О присуждении гражданину Российской Федерации, Минайчеву Владиславу Валентиновичу, учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Клеточные и тканевые аспекты биосовместимости кальций-фосфатных соединений, полученных низкотемпературным синтезом» по специальности 1.5.22. – «клеточная биология» принята к защите 18 апреля 2024 г. (протокол заседания № 82), диссертационным советом 24.1.232.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 142290 Московская обл., г. Пушкино, проспект Науки, д.3, приказ Минобрнауки России от 07 ноября 2019 года РФ №1069/нк, с изменениями, внесенными приказами Минобрнауки России № 118 от 24 февраля 2021, №561/нк от 3 июня 2021 г., № 24/нк от 28 января 2021 г., № 1162/нк от 12 октября 2022 г. и № 475/нк от 21 мая 2024 г.

Соискатель Минайчев Владислав Валентинович, 25 июня 1995 года рождения, в 2016 г. окончил бакалавриат ФГБОУ ВО Тульского государственного педагогического университета им. Л. Н. Толстого с присуждением степени бакалавра «Педагогическое образование (с двумя профилями подготовки - «Биология, Химия»)). В 2018 г. закончил магистратуру ФГБОУ

ВО Пущинский государственный естественно-научный институт (ПущГЕНИ) на базе Учебного центра биофизики и биомедицины ФГБУН Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН) по направлению подготовки «Биология» по профилю «Биофизика и медико-биологические науки». В 2022 г. окончил очную аспирантуру на базе ИТЭБ РАН с присуждением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь» по специальности 03.03.01 Физиология. В период подготовки диссертации соискатель работал в ИТЭБ РАН в должности младшего научного сотрудника, а в настоящее время работает в должности научного сотрудника в лаборатории биомедицинских технологий ИТЭБ РАН.

Диссертация выполнена в ИТЭБ РАН. Научный руководитель – кандидат биологических наук Фадеева Ирина Сергеевна, зав. лабораторией биомедицинских технологий ИТЭБ РАН.

Официальные оппоненты:

Бонарцев Антон Павлович, доктор биологических наук, доцент кафедры биоинженерии биологического факультета ФГБОУ ВО Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова;

Деев Роман Вадимович, кандидат медицинских наук, доцент, первый зам. директора НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российского научного центра хирургии им. академика Б.В. Петровского»

дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» МЗ России), в своем **положительном** отзыве, подписанном Ковалевым Алексеем Вячеславовичем, кандидатом медицинских наук, зав. лабораторией клеточных технологий и медицинской генетики и утвержденном доктором медицинских наук, профессором РАН Назаренко

Антоном Герасимовичем, директором ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» МЗ России, отметила, что диссертационная работа Минайчева В. В. является научно-квалификационной работой, в которой рассмотрены основные особенности клеточного и тканевого ответа биологических систем на кальций-фосфатные соединения, полученные при физиологических температурах, а также пути повышения их биосовместимости. Диссертация соответствует всем требованиям ВАК, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, отраженным в «Положении о присуждении ученых степеней» (п.п. 9-14, утверждено постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. с изменениями постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335; от 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 № 650; от 20.03.2021 г. № 426), а диссертант заслуживает присуждения Минайчеву Владиславу Валентиновичу ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – «Клеточная биология».

Соискатель имеет 52 опубликованные работы, в том числе по теме диссертации – 20 научных работ общим объемом 5,92 печатных листа, из них – 8 статей опубликованы в ведущих рецензируемых научных изданиях (WoS, Scopus), которые включены в перечень ВАК РФ для опубликования основных научных результатов диссертаций, 11 тезисов докладов на всероссийский и международных научных конференциях и 1 патент на изобретение РФ.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Minaychev V.V.**, Teterina A.Y., Smirnova P.V., Menshikh K.A., Senotov A.S., Kobyakova M.I., Smirnov I.V., Pyatina K.V., Krasnov K.S., Fadeev RS, V. S. Komlev, I. S. Fadeeva Composite Remineralization of Bone-Collagen Matrices by Low-Temperature Ceramics and Serum Albumin: A New Approach to the Creation of Highly Effective Osteoplastic Materials, J. Funct. Biomater., 2024, V.15(2). DOI: 10.3390/jfb15020027. – Соискатель участвовал в планировании, получении исследуемого материала, проведении экспериментов на моделях *in vitro* и *in*

vivo, статистической обработке и визуализации полученных данных, написании статьи.

2. **Minaychev V.V.**, Smirnova P. V., Kobayakova M. I., Teterina A. Y., Smirnov I. V., Skirda V. D., Alexandrov A. S., Gafurov M. R., Shlykov M. A., Pyatina K. V., Senotov A. S., Salynkin P. S., Fadeev R. S., Komlev V. S., Fadeeva I. S. Low-Temperature Calcium Phosphate Ceramics Can Modulate Monocytes and Macrophages Inflammatory Response In Vitro, *Biomedicines*, 2024, V.12(2). DOI: 10.3390/biomedicines12020263. – Соискатель участвовал в планировании и проведении экспериментов на модели *in vitro*, обработке и визуализации полученных данных, написании статьи.

3. Teterina A. Y., **Minaychev V. V.**, Smirnova P. V., Kobayakova M. I., Smirnov I. V., Fadeev R. S., Egorov A. A., Ashmarin A. A., Pyatina K. V., Senotov A. S., Fadeeva I. S., Komlev V. S. Injectable Hydrated Calcium Phosphate Bone-like Paste: Synthesis, In Vitro, and In Vivo Biocompatibility Assessment, *Technologies*, 2023, V.11(77). DOI: 10.3390/technologies11030077. – Соискатель участвовал в разработке концепта статьи, проведении экспериментов *in vivo* и *in vitro*, обработке и визуализации полученных данных.

4. Teterina A. Y., Smirnov I. V., Fadeeva I. S., Fadeev R. S., Smirnova P. V., **Minaychev V. V.**, Kobayakova M. I., Fedotov A. Y., Barinov S. M. Komlev V. Octacalcium Phosphate for Bone Tissue Engineering: Synthesis, Modification, and In Vitro Biocompatibility Assessment, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, V.22(23). DOI: 10.3390/ijms222312747. – Соискатель участвовал в разработке концепта статьи, проведении экспериментов *in vitro*, обработке и визуализации полученных данных, написании статьи.

5. **Minaychev V.V.**, Kirsanova P.O., Zvyagina A.I., Odintsova A.S., Fadeeva I.S., Akatov V.S. Aggregation of Hydroxyapatite Particles and Inhibition of Cell Adhesion on this Bio-Active Material as Key Factors that Limit its Biointegration, *Biophysics*, 2019, V. 64 (5). DOI: 10.1134/S0006350919050154. Соискатель участвовал в проведении экспериментов, обработке полученных данных, написании статьи.

В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах и текст не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

официального оппонента д.б.н. Бонарцева А. П. – отзыв положительный. Замечания и вопросы: 1) «Почему не использовались общепризнанные методы стерилизации (оксид этилена, автоклавирование и др.)?» 2) «В чем именно новизна наблюдаемого в работе явления гетеро-топического остеогенеза реминерализованного ксеногенного костного матрикса?» 3) «Каков литературный источник определений в разделе «Термины и Определения?»» 4) Не ясно, в каких единицах выражен Модуль Юнга на стр. 18.

официального оппонента к.м.н. Деева Р. В. – отзыв положительный. Замечания: 1) редакционного характера (опечатки, жаргонизмы, терминологические неточности (например, биосовместимость, остеокондукция, остеогенность, эктопия, гетеротопия) и избыточность используемых в литобзоре рисунков (высказано пожелание ограничить их число объемом разумной необходимости или заменить на обобщающие); 2). слабо отражены отечественные источники в библиографическом списке; 3) в формулировке выводов и (или) положений, выносимых на защиту следовало привести количественные данные, которые приведены в разделах результаты и заключение; 4) в разделе «Материалы и методы» в части касающейся работы с животными следовало указать дату и номер решения локального этического комитета того или иного уровня, одобрявшего протокол исследования. 5) Вопросы дискуссионного характера: 1) «Какие виды клеточно-опосредованной костной резорбции известны автору и удалось ли обратить на них внимание в ходе экспериментов *in vivo*?» 2) «Какие преимущества для оценки клеточных/внутриклеточных процессов дало использование суспензионных клеточных культур в экспериментах *in vitro* и удалось ли проследить особенности взаимодействия свободных/мигрирующих

(блуждающих) клеток и кальций-фосфатных материалов *in vivo*?» 3) «Насколько данные по цитотоксичности, полученные на immortalized (частично трансформированных) клеточных культурах, могут быть применимы для объяснения процессов, выявляемых *in vivo*?» 4) Важно уточнить, как на препаратах определялись границы тканевых образований (грануляционной и фиброзной тканей), поскольку это пока еще остается не всегда легко решаемой задачей, ибо обе они представляют собой реактивно измененную соединительную ткань, и что в большей степени характеризует определяемый параметр (коэффициент, введенный автором в аналитический аппарат и определяющий соотношение грануляционной и фиброзной тканей) – стадию раневого процесса или специфическую особенность взаимодействия конкретного кальций-фосфатного материала с тканями реципиентного ложа? 4) «Вследствие каких цито- и гистогенетических процессов на поверхности костных трабекул деминерализованного костного матрикса после его пропитывания дикальций дифосфатом появляются остеобласты в гетеротопическом тканевом ложе?»

Ведущая организация – отзыв **положительный**. Замечания и вопросы:

1). в обзоре литературы практически не рассмотрен вопрос влияния температуры синтеза кальций-фосфатных материалов на их биологические свойства и структуру поверхности; 2) не ясно, за счет чего повышаются osteoconductive свойства пастообразного гидратированного ГАп-материала, полученного путем низкотемпературного синтеза. Есть ли особенности влияния именно порошкообразной формы ГАп-материала на живые ткани и костную регенерацию? 3) В исследовании продемонстрировано, что деминерализованный костный матрикс не проявляет osteoinductive эффекта. Это противоречит данным о том, что osteoinductive свойства деминерализованных alloimplants находятся в прямой зависимости от степени деминерализации костной ткани. Чем выше степень деминерализации костных имплантатов, тем более выражен эффект их влияния на пролиферативный клеточный потенциал кожных фибробластов

и остеогенных стромальных клеток- предшественников в системе *in vitro*, а также на формирование эктопической кости. Как это объяснить? 4) Деминерализованный костный матрикс – деминерализованная костная ткань (природный материал) комбинируется с низкотемпературными предшественниками гидроксиапатита. Насколько обоснованно относить такой продукт к биомиметическим материалам? 5) орфографические ошибки, опечатки и неточности есть в диссертации и автореферате.

Положительные отзывы на автореферат представили:

1. д.б.н. Севастьянов В. И., директор Автономной некоммерческой организации «Институт медико-биологических исследований и технологий» (без замечаний);

2. к.т.н. Федотов А. Ю., в.н.с. ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А. А. Байкова РАН (без замечаний);

3. к.т.н. Котякова К. Ю., н.с. Научно-исследовательского центра «Неорганические наноматериалы» Национального исследовательского технологического университета «МИСИС». Замечания: 1) не ясно, почему увеличение концентрации Sr^{2+} при замене на Ca^{2+} на рис. 9, так неоднозначно влияет на содержание кислых компартментов (А), потенциал митохондриальной мембраны (Б) и активных форм кислорода (В) относительно чистого октакальций фосфата; 2) рекомендательного характера; 3) стилистические неточности и наличие сленговых выражений.

4. кандидат биологических наук Попов А. Л., зав. лабораторией тераностики и ядерной медицины ИТЭБ РАН. Замечания: 1) кратко описана актуальность с точки зрения проблем биосовместимости с учетом используемой схемы синтеза и физико-химических характеристик получаемых материалов; 2) ошибки и опечатки в тексте автореферата.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что д.б.н. Бонарцев А.П., является компетентным специалистом в области разработки, создания и исследования медико-биологических свойств медицинских изделий и лекарственных форм на основе биоразлагаемых полимеров, регенерации

тканей и тканевой инженерии; к.м.н. Деев Р.В. является специалистом в области гистологии и патоморфологии, клеточной и молекулярной биологии, травматологии и ортопедии. Они имеют публикации по соответствующим темам в ведущих научных журналах.

Выбор ведущей организации обосновывается тем, что ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» МЗ России известен своими достижениями в области травматологии и ортопедии, а также разработке и исследовании биологических свойств остеопластических материалов, что позволяет произвести экспертную оценку полученных в диссертационной работе результатов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Разработана технология низкотемпературного осаждения дигидрата дикальций фосфата на поверхность полностью деминерализованного костного матрикса и показаны остеогенные свойства полученного материала.

впервые показано, что уменьшение содержания кристаллической фазы в пастообразном гидратированном гидроксиапатите, синтезированном при низкой температуре, улучшает его биосовместимость и повышает остеокондуктивные свойства в организме.

впервые установлено, что наименьший цитотоксический эффект *in vitro* и наибольшую биологическую безопасность и остеокондуктивность *in vivo* среди исследованных кальций-фосфатных соединений (КФС) – предшественников гидроксиапатита, проявляет дигидрат дикальций фосфат.

впервые показано, что введение ионов стронция Sr^{2+} в структуру октакальций фосфата приводит к снижению его цитотоксичности *in vitro*, повышению биологической безопасности образцов и проявлению остеокондуктивности *in vivo*.

показано, что более выраженный цитотоксический эффект в условиях *in vitro* среди исследованных соединений был выявлен для зависимых от прикрепления клеток, что послужило основанием для предположения о

возможной связи данного эффекта с неспецифической адгезией КФС к клеточной поверхности.

Теоретическая значимость исследования заключается в расширении существующих представлений об особенностях взаимодействия КФС, полученных низкотемпературным синтезом, с клетками и тканями организма, что, в свою очередь, способствует более глубокому пониманию процессов репаративно-регенеративного остеогенеза и биоинтеграции синтетических материалов.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики заключается в том, что предложенные в работе подходы, такие как замещение ионов Ca^{2+} на Sr^{2+} в структуре октакальций фосфата, а также новый метод биомиметического осаждения дикальцит фосфата дигидрата на ксеногенный деминерализованный костный матрикс могут быть использованы для создания новых высокоэффективных остеопластических материалов как в виде материалов наполнителей (крошка или гранулы), так и протезов различной формы для нужд травматологии, ортопедии и реконструктивной хирургии костной ткани.

Применительно к проблематике диссертации результативно (эффективно, т.е. с получением обладающих новизной результатов) использован комплекс современных методов клеточной биологии, гистологии и биофизики, включая рентгенофазовый анализ, ИК-спектроскопию, микрокомпьютерную томографию, сканирующую электронную микроскопию, проточную цитометрию, флуоресцентную и конфокальную микроскопии, спектрофото- и флуорометрию, методы гетеротопической имплантации, криотомии, дифференциальный гистохимический анализ, цифровую обработку микроскопических изображений.

Оценка достоверности результатов исследования выявила их высокую надежность, которая обеспечивается большим количеством проанализированного материала, достаточным количеством повторов, репрезентативностью и воспроизводимостью результатов в разных

экспериментах, проведенных с использованием КФС на культурах постоянных клеточных линий и лабораторных животных с соразмерными контролями. Все полученные данные хорошо проиллюстрированы, а полученные результаты соответствующим образом статистически обработаны с использованием методов непараметрической и параметрической статистики.

Достоверность также обеспечивается тем, что результаты получены на сертифицированном оборудовании с использованием современных методов клеточной биологии, гистологии и биофизики, соответствующих поставленным целям и задачам;

идея базируется на анализе собственных результатов и данных, представленных в современной научной литературе;

установлено качественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках;

использованы современные компьютерные методы анализа и статистической обработки экспериментальных данных с использованием специального программного обеспечения (NIS Elements, Image J) и языков программирования Python 3 и R;

Полученные данные прошли экспертизу в рецензируемых научных журналах и докладах на российских и международных научных конференциях. Большинство авторских результатов получено впервые.


Личный вклад автора определяется его непосредственным участием на всех этапах проведенных исследований, включая планирование и проведение большинства экспериментов, обработку и интерпретацию экспериментальных данных, подготовку публикаций и представление результатов на научных конференциях. Основные результаты получены автором самостоятельно. Часть работ, включающая получение и физико-химическую характеристику исследованных КФС, выполнена в ФГБУН Институте биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН и ФГБУН Институт металлургии и материаловедения имени А. А. Байкова РАН.

В ходе защиты диссертации Минайчева В. В. не было высказано критических замечаний. Соискатель в полной мере ответил на заданные ему в ходе заседания вопросы, касающиеся химического состава кальций-фосфатной гидратированной пасты (КФП), о влиянии температуры на структурную организацию при синтезе КФП и способах определения их фазового состояния, о способах получения стронция (Sr^{+2})-замещенного октакальций фосфата и пастообразного материала с ионами Sr^{+2} , об определении оптимального соотношения между концентрациями Ca^{+2} и стронция Sr^{+2} , о зависимости цитотоксичности КФС от концентраций $[\text{Ca}^{+2}]$ и $[\text{Sr}^{+2}]$, о выведении накопленного Sr^{+2} из костной ткани, о механизме подавления активных форм кислорода Sr^{+2} -замещенным октакальций фосфатом, о параметрах, определяемых методами ИК-спектроскопии и рентгено-фазового анализа.

На заседании 20 июня 2024 года, протокол № 86, диссертационный совет **принял решение:** за исследование особенностей клеточных и тканевых процессов, протекающих при взаимодействии различных кальций-фосфатных соединений, полученных низкотемпературным синтезом, с живыми системами и представление возможных стратегий повышения их биологической совместимости присудить Минайчеву В. В. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 6 докторов наук по специальности 1.5.22. – клеточная биология, участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав учёного совета, проголосовали: за присуждение учёной степени – 19, против присуждения учёной степени – 0, недействительных бюллетеней – 0.

Председатель
диссертационного совета 24.1.232.01


д.б.н., проф. Озолин О. Н.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.232.01

д.б.н. Дегтярева О. В.

20 июня 2024 г.

