

**ОТЗЫВ**  
**ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**  
**на диссертацию Белоконь Марии Александровны**  
**на тему: «Использование сшивающих реагентов ковалентного или ионного**  
**типа для получения материалов медико-биологического**  
**назначения на основе гидрогелей хитозана», представленную**  
**на соискание ученой степени кандидата технических наук**  
**по специальности 05.17.06: «Технология и переработка полимеров и**  
**композитов»**

Полимерные материалы, в т.ч. в форме гидрогелей и, в частности, хитозан являются перспективным классом в создании систем для направленной доставки лекарств.

Важным фактором, ограничивающим применение хитозана в качестве полимера для контролируемого высвобождения лекарств, является его быстрое набухание в кислой среде и биodeградация, что приводит к снижению пролонгации высвобождения препаратов. Один из способов избежать этого – модификация хитозана за счет сшивок, снижающих набухание и растворимость полимера и соответственно скорость высвобождения импрегнированного в нем лекарства, увеличивая продолжительность терапевтического воздействия. Преимущество в этом случае, исходя из утверждений диссертанта, отдается полимерам в форме наночастиц, которые способны легко проникать через биологические барьеры (к сожалению, о природе этих наночастиц и механизме их формирования автор не говорит).

Разработка технологии получения материалов для направленного подведения импрегнированных лекарств, БАВов и т.д., несет в себе большие сложности. Следует обеспечить условия, чтобы при необходимом технологическом времени сшивки достичь нужных механических показателей системы, стабильности параметров, требуемых по медицинским показаниям (с точки зрения времени и полноты высвобождения лекарств); требуется разработка так называемой технологии «отложенного структурирования».

Исходя из сказанного следует признать, что нахождение научно обоснованного способа модификации биополимеров и, в частности, хитозана за счет использования

ФГБОУ ВО «РГУ им. А.Н. Косыгина»

Входящий № \_\_\_\_\_

Дата 02 МАЙ 2017

сшивающих реагентов является актуальной, но очень трудной задачей, решение которой имеет как научную, так и практическую значимость. Разработка новых полимерных материалов на основе хитозана, обладающих пролонгированным эффективным лечебным действием – это еще один шаг в решении проблемы улучшения здоровья людей, помощи больным людям, проблемы, актуальной во все времена. Соответственно, не вызывает сомнений актуальность анализируемой диссертации.

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием большого набора современных высокоточных методов исследования, выбор которых связан с большим количеством различных экспериментов. Среди них атомно-силовая и конфокальная лазерная микроскопия, ИК- и УФ- спектроскопия, реологические методы, большой объем биологических исследований.

Научная новизна заключается в изучении взаимодействия ионных сшивающих агентов триполифосфата натрия и пирофосфата калия с функциональными группами хитозана; в результате показано, что лучшими условиями для сшивки являются  $\text{pH} = 6,0$ , при котором степень протонирования хитозана 0,62 и количество фосфатных групп в сшивающих агентах больше двух; в разработке нового способа получения нерастворимых пленок с лекарствами и установлении необходимого мольного соотношения аминогрупп хитозана-сшивающего агента, определяющего растворимость и фармакокинетические свойства пленок; в установлении механизма реакции сшивки хитозана и природного сшивающего агента дженипина, определении влияния в широком диапазоне  $\text{pH}$  на процесс гелеобразования молекулярной массы хитозана, температуры, концентрации компонентов композиции; в выяснении особенностей механизма и кинетики высвобождения лекарств из системы хитозан-сшивающий агент дженипин.

Новизна работы также подтверждается получением патента РФ на способ получения пленок из хитозана со сшивающими препаратами ионного типа – полифосфатами, а так же новизна и актуальность подтверждаются включением ее в план базовой части Госзадания Минобрнауки РФ в сфере научной деятельности на 2014-2016 гг. (проект № 2698) и гранта РФФИ № 15-04-07669.

Практическая значимость заключается в разработке способов получения пленок на основе хитозана с различными сшивающими агентами и апробации пленок, полученных сшивкой полифосфатами, в клинических условиях при проведении антимикробной и противовоспалительной терапии полости рта, в рекомендации для применения созданных материалов в пародонтологии, терапевтической, хирургической, ортопедической стоматологии.

Литературный обзор очень объемный и характеризует диссертанта как вдумчивого работоспособного исследователя. Большой насыщенный литературный обзор, который



имеет отдельную ценность для специалистов, работающих в рассматриваемой области, мог быть написан только после детального изучения большого объема публикаций по изучаемой проблеме. Принцип построения литературного обзора, а именно анализ из многих гелеобразующих полимеров только хитозана и описание вариантов сшивки только этого полимера, имеет право на существование, это выбор автора. Автор приводит множество экспериментальных данных, касающихся системы хитозан-сшивающий агент, детально их анализирует, описывает различные с точки зрения препаратов и условий сшивки варианты, используемые в медицинской практике. Это, бесспорно, интересно, но такой объем данных мешает их анализу, не позволяет порой автору диссертации высказать свое мнение по рассматриваемым вопросам. Очень много данных по описанию возможных сшивающих агентов и условий реакции сшивки.

Это, конечно, имеет прямое отношение к объекту исследования, однако сложно, например, понять, почему автор, критикуя глутаровый альдегид за токсичность, уделяет ему столько внимания и в литературном обзоре, и в каждой (практически) главе экспериментальной части. Так же не совсем ясен выбор в качестве сшивающих агентов полифосфатов и особенно дженипина. Конечно, использование природных соединений, «зеленой химии» надо приветствовать, но следует четко обосновать выбор препарата, получаемого путем ферментативного гидролиза  $\beta$ -глюкозидазой материалов из плодов двух экзотических растений, одно из которых растет на Дальнем Востоке, а другое – Южной Америке. Возможно, сегодня, в век глобализации, в век экологических приоритетов, это оправдано, но желательно было бы более четко обосновать выбор для исследования этого сшивающего агента (известного с 60-х годов прошлого века), в т.ч. его применение с экономических позиций и доступности в РФ.

Выше отмечалось хорошее знание диссертантом литературы в изучаемой области, однако несколько удивляет, что список литературы (это касается не только литературного обзора, но и всей работы) в очень большой степени посвящен исследованиям иностранных ученых, а работы отечественных – а их множество! – остались без внимания, даже работы первого оппонента рассматриваемой диссертации, крупнейшего специалиста в области полимеров для медицины М.И. Штильмана, проф. Хохлова А.Р., Филиповой О.Е., Гальбрайха Л.С., И.М. Липатовой и др. Это бы усилило работу, даже принимая позицию автора, сделавшего в литературном обзоре «упор» на публикации, касающиеся только хитозана как биополимера.

В целом литературный обзор производит хорошее впечатление, а четкие выводы из него служат убедительной основой для формулировки основных направлений работы и задач, решаемых в экспериментальной части.

Методическая часть работы заслуживает очень высокой оценки. Применяемые методики можно принципиально разделить на две части: «классические», характерные



для исследования полимеров и, конечно, необходимые, и современные высокотехнологические методы исследования (атомно-силовая и конфокальная лазерная микроскопия, ИК- и УФ- спектроскопия), которые в последние годы все больше применяются для анализа полимеров. Можно только всячески приветствовать совместную работу диссертанта и специалистов различных Академических институтов. Это дало возможность привлечь для оценки экспериментов новейшие методы, получить однозначные доказательства, и, кроме того, диссертант прошел прекрасную научную школу, которая помогла ему стать настоящим серьезным специалистом. Такой подход к обучению молодых исследователей при написании диссертации стоит только приветствовать.

Среди вопросов, возникших при рассмотрении методической части:

- метод динамического рассеяния света не позволяет определить наличие наночастиц и требует дополнения электронной микроскопии;
- кем разработана методика определения времени гелеобразования (ссылка отсутствует);
- не указана концентрация мирамистина в образцах, это важно для дальнейшего технологического продвижения и определения эффективности материалов;
- в методической части (стр.60) описана методика определения степени набухания, а про определение влагопоглощения не сказано. Так же на стр.124, рис.62, приводятся данные относительно степени набухания, а по влагопоглощению – нет. Не ясно, в каких случаях используется один из этих параметров, а в каких другой?;
- чем обоснован выбор лекарственных препаратов, в частности, мирамистина (в экспериментальной части используется мирамистин, а антимикробная активность проверяется с фурагином и хлоргексидином)?

#### Экспериментальная часть.

Определяя цель диссертационной работы (создание материалов медико-биологического назначения), автор для ее достижения ставит задачу – разработать научную основу для получения лечебных материалов с комплексом различных свойств путем варьирования способов сшивки хитозана и, используя полученные данные, подойти к созданию технологии их получения. Принципиально был возможен и другой вариант – на основе разработки базовой технологии получения сшитых хитозановых пленок, варьируя технологические приемы, создавать материалы с комплексом специфических свойств. В первом случае упор должен быть сделан на химическое и физико-химическое рассмотрение процессов, а во втором – в большей степени на их технологическое оформление. Диссертант выбирает первый путь, и это его право как автора исследования.



### Краткий анализ содержания экспериментальной части.

Диссертант обоснованно утверждает, что получение нерастворимых пленок из хитозана зависит от количества ионных сшивок, возникающих при введении сшивающих агентов, а это, в свою очередь, от соотношения положительно заряженных групп хитозана и отрицательных фосфатных ионизированных групп. Поэтому бесспорный научный и практический интерес представляют полученные экспериментальным и расчетным путем данные по определению оптимальных условий, при которых происходит ионная сшивка; это область значений pH, в которой протонированы аминокруппы хитозана и в которых они заряжены положительно, а сшивающих агентов – триполифосфата натрия или пирофосфата калия – отрицательно (т.е. необходимо найти «золотое сечение»). Получается очень интересная картина, так как  $pH=6$ , – это практически нейтральная среда.

Эта часть исследования (экспериментальная) подкреплена применением таких методов как кондуктометрия и нефелометрия, позволивших оценить взаимодействия, происходящие в растворе хитозана при введении сшивающих агентов в широком интервале pH, то есть при различной степени протонирования хитозана. Сделан (ожидаемый) вывод, что увеличение числа ионногенных групп приводит к росту электропроводности, а образование ионных связей с триполифосфатом натрия (ТПФ) увеличивает число протонированных групп, что приводит к падению электропроводности. Диссертант предполагает (количественных данных нет), что в результате межмолекулярной сшивки происходит рост молекулярной массы хитозана, появление в растворе кластеров и новой фазы, что, естественно, приводит к снижению растворимости; с этим предположением следует согласиться. Важный практический вывод из этой части работы – возможность ионной сшивки хитозана ТПФ и ПФ в рассматриваемом диапазоне pH. Это следует учитывать при создании материалов медицинского назначения, как при их получении, так и применении для различных областей организма, имеющих отличия в pH.

При оценке научной значимости работы следует отметить утверждение о формировании наночастиц в кислом растворе хитозана при добавлении ТПФ. Автор не поясняет, что он понимает конкретно под наночастицами, какова их природа и механизм образования; так как для такого утверждения используется метод динамического рассеяния, то требуется более прямое доказательство с помощью просвечивающей и зондовой электронной микроскопии.

Интересные данные по набуханию хитозановых пленок в зависимости от концентрации использованных для сшивки ТПФ или ПФ. Отметим, что диссертант для описания одного и того же явления использует как термин «набухание», так и «водопоглощение» (гл. 3.1.2). При 0,1 % ТПФ скорость набухания (и степень) выше, чем



при 1,0 % ТПФ (скорость в этом случае несколько выше, а степень ниже); во всех случаях равновесие (по изучаемому параметру) наступает быстро – не более чем за 30 минут. Эти данные очень важны для практического использования полимерных пленок, в которых введено лекарство. Знание этих вопросов позволяет создать пленочные материалы на основе хитозана с заданными по медицинским показаниям профилем высвобождения введенного в них лекарства во внешней среде (в организме). Автор показывает, как химическое строение лекарства (например, наличие амидной и аминной групп в лидокаине), влияет через взаимодействие с ТПФ на количество сшивок, а затем опосредовано и на высвобождение лекарства.

Надо отметить как положительный факт, что диссертант честно критически оценивает технологические недостатки предполагаемого способа модификации пленок из хитозана полифосфатами, заключающегося в помещении свежесформованной пленки в водные растворы ТПФ и ПФ, промывки и высушивании пленки; однако эта технология позволила установить закономерности, имеющие место при ионной сшивке хитозана, они важны в научном плане и их следует рассматривать как данные, необходимые для дальнейшей разработки практически реализуемой технологии.

Более технологичным (на сегодняшний день) следует считать другой предложенный диссертантом способ модификации с использованием ионной сшивки при получении пленок, а именно добавление ТПФ в формовочный раствор хитозана.

Диссертант предлагает интересный прием – использовать более концентрированный раствор хитозана, но при этом поднимать температуру, при которой происходит сшивка, за счет чего вязкость концентрированных растворов несколько снижается и полифосфаты способны проникать внутрь пленки, распределяясь по ее объему, образуя сшивки не только в месте введения, но и в объеме, структуре пленки. Автор доказывает это с помощью рамановской спектроскопии, придавая этим данным отдельную научную значимость.

Возникающее распределение сшивок по объему пленки и его зависимость от концентрации полифосфата определяют степень набухания пленки и растворимость, что в свою очередь влияет на скорость и полноту высвобождения введенного в пленку лекарства. Показано, что варьируя концентрацию полифосфата можно менять растворимость пленки (до полного растворения) и ее свойства как носителя лекарств. К сожалению, представленные кинетические кривые массопереноса лекарств из пленок не позволяют в полной мере говорить о пролонгации их лечебного действия. Например, препарат десорбирует из пленки (рис.36) и продолжает поддерживать концентрацию во внешней среде, выйдя на равновесное значение, 100 минут. Не ясно, что происходит в дальнейшем, сколько времени будет поддерживаться концентрация (и какая) во внешней среде, особенно с учетом малого модуля этой среды и постоянного уноса части



препарата в кровоток. Автор явно не ставил перед собой задачу – изучить особенности массопереноса, вероятно, этот интересный и реально необходимый анализ будет сделан в дальнейшем.

Желательно объяснить, почему увеличение набухания при сравнении (1) – поверхностного и (2) – объемного способа модификации почти в 20 раз так несущественно меняет кинетику десорбции растворимого препарата мирамистина (табл.5, стр.91).

Оригинальный материал – изучение кинетики и механизма взаимодействия хитозана с дженипином, исследование кинетики изменения поглощения в системе хитозан-дженипин с целью наблюдения за процессом сшивки хитозана. На основании полученных данных по наличию в электронных спектрах новой полосы поглощения 610 нм при реакции в растворе хитозана, содержащего дженипин, делается вывод о димеризации дженипина. На основании спектральных данных и кинетических изменений делается предположение о химизме сшивки.

Автор анализировал степень сшивки хитозана дженипином и им показано, что изменение степени модификации аминогрупп хитозана происходит пропорционально изменению содержания дженипина, однако абсолютные значения числа зацеплений превышают максимально возможную степень сшивки макромолекул хитозана. Из этих интересных результатов делается обоснованный технологический вывод, говорящий о возможности прогнозировать физико-механические свойства пленок за счет варьирования соотношения полимер-сшивающий-агент-растворитель.

Соображения по поводу структуры пленки, формируемой при соотношении дженипин-хитозан 0,02 моль/моль (гл.3.2.3.) можно принять только как факт, природа которого пока не подтверждена; возможно, не стоит ждать от одной кандидатской диссертации объяснений всех данных, полученных при проведении исследования. Следует лишь принять обнаруженный факт необычного увеличения в процессе испарения растворителя прочности пленки при низком содержании сшивающего агента и использовать это на практике.

Еще одна часть работы посвящена получению матриц на основе хитозана. Эта сегодня актуальное, развивающееся во всем мире научное направление. Эксперимент выполнен диссертантом на современном оборудовании, с хорошим научным обоснованием результатов. Показано (и доказано), что варьирование состава композиции (раствор хитозана и сшивающий реагент) позволяет получить матрицы, различающиеся по морфологии, размеру пор и вследствие этого по различному распределению в них живых клеток. Указана важная роль сшивающего агента (дженипина или глутарового альдегида) в этом процессе. В этой части диссертации автор опять возвращается к сравнению глутаровый альдегид – дженипин в пользу



последнего, объясняя это данными по токсичности альдегида. Однако тестированием диссертантом получаемых материалов с использованием хитозана и двух изучаемых сшивающих агентов доказано, что в обоих случаях продукты взаимодействия хитозан-сшивающий агент и, соответственно, матрицы не обнаружили принципиального различия в токсичности, жизнеспособность клеток высока и значения в обоих случаях близки. Это существенно «оправдывает» глутаровый альдегид.

Глутаровый альдегид присутствует во всех частях работы – о нем пишется, его упоминают, его ругают за токсичность, объясняют необходимость замены, но с ним не расстаются, и в последней части диссертант даже получает с ним неплохие результаты.

Что касается части работы по созданию матриксов (скаффолдов) на основе хитозана, сшитых дженипином или глутаровым альдегидом, то эти части исследования стоят несколько отдельно от предыдущих. Автор убедительно доказывает целесообразность, важность создания матрикса именно на основе гелей хитозана для выращивания клеток, формирования новых тканей, но предлагаемая технология их получения принципиально другая – путем замораживания и лиофилизации.

Интересные биохимические, да и химически значимые результаты этой главы стоят несколько отдельно от всей работы и по использованным методам изучения, и по построению эксперимента; эта часть имеет существенно большую биологическую направленность. Конечно, в этой части прослеживается связь с основным названием работы, то есть, исследована роль сшивающих агентов, сделан их выбор для получения материалов медико-биологического назначения, но технологии получения этих материалов уделено мало внимания.

Отметим еще раз, что работа может быть условно (не по оглавлению) разделена на три части: первая – использование сшивающих агентов (триполифосфат натрия, пирофосфат калия) для ионного типа сшивки хитозана; вторая – использование ковалентного взаимодействия хитозана и сшивающих агентов – в первую очередь дженипина, относительно нового природного соединения и широко и давно используемого глутарового альдегида, третья часть, проистекающая из второй, – использование глутарового альдегида и дженипина для создания скаффолдов, наполненных не лекарствами, как в первых двух случаях, а клетками.

Из сказанного следует, что представленная работа очень объемная и разноплановая; создание материалов медико-биологического назначения в каждом случае требует разработки своей технологии, и объединить эти технологии под общий знаменатель практически не реально.

Учитывая высокий научный уровень диссертации, интерес, возникающий при ее прочтении и анализе, следует сделать некоторые замечания, которые не носят



принципиального характера, а ставят своей целью помочь автору в его дальнейшей работе, заострить внимание на некоторых возникающих вопросах.

1. Вопрос разработки технологии получения полимерных материалов на основе хитозана, обладающих медико-биологическими свойствами, как уже отмечалось ранее, очень сложный, и в данной диссертационной работе, где рассмотрены три способа получения материалов по принципиально разным схемам, не реально ожидать базового технологического решения для всех трех схем. Для разработки единой (или модифицированной для каждого конкретного случая) технологии необходимо автору оценить, для каких случаев использования (по медицинским показаниям) создается материал, соответственно должна ли пленка подвергаться биodeградации (в данном случае говорится о нерастворимой пленке, значит применяемой только наружно) и за какое время, каков объем биологической жидкости в зоне, где используется создаваемый материал, и ее pH. В литературе описаны полезные свойства дженипина, определяющие его применение при заживлении ран, при сахарном диабете, катаракте, периодонтите и т.д. Диссертанту желательно оценить, какие свойства медицинских материалов в большей или меньшей степени обеспечивает каждый из изученных и научно обоснованных способов их получения.
2. Важнейший вопрос при разработке технологии – стерилизация изделий, так как используемые медицинские материалы обязательно должны быть стерильными. По какой технологии предполагается их стерилизовать? Что будет происходить при этом с полимером?
3. Поскольку данная работа рассматривает получение материалов медико-биологического назначения (медицинских изделий), то такие материалы по ГОСТам должны соответствовать показателю «стерильность», что подтверждается протоколами соответствующих испытаний. Обеспечивает ли методика стерилизации, приведенная на стр. 62, стерильность изготовленных образцов (нет ссылок на литературу, касающуюся данной методики)? В протоколе испытаний (стр.150) приводятся результаты испытаний полученных образцов только относительно антимикробной активности полимерных материалов медицинского назначения, а по показателю «стерильность» испытания не проводились, хотя этот показатель является одним из основных в технологии получения данных материалов.

Работа аккуратно оформлена, написана хорошим языком, грамотно, и некоторые мелкие погрешности в оформлении (страница 79, описание рисунка 29 совпадает с описанием рисунка 36 на странице 88, последний абзац, слово в слово) не влияют на это мнение.



которой отвечают высокому уровню и требованиям к научным исследованиям, а полученные автором результаты вносят значительный вклад в дальнейшее развитие научного направления по созданию медицинских материалов на основе биополимера хитозана.

В целом, диссертационная работа М.А. Белоконь является завершенным научным трудом, результаты которого нашли отражение в 19 печатных работах, в том числе 6 статьях в рецензируемых журналах из Перечня ВАК РФ и 1 патенте РФ.

Основные положения работы доложены и получили положительную оценку на многих международных и всероссийских конференциях.

Содержание автореферата с достаточной полнотой отражает основные положения и результаты, полученные при выполнении диссертации.

Диссертация Белоконь М.А. на соискание ученой степени кандидата технических наук является законченной научно-квалифицированной работой, в которой содержится решение научной задачи обоснования выбора сшивающих реагентов для использования в технологии получения на основе хитозана материалов медико-биологического назначения, имеющей значение для развития химических методов модификации в технологии переработки полимеров.

По актуальности, объему исследований, научной новизне и практической значимости результатов диссертационная работа соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п.9-14 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Правительством Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842), а ее автор Белоконь Мария Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 05.17.06 – Технология и переработка полимеров и композитов.

Доктор технических наук по  
специальности 05.19.03 -  
Технология текстильных  
материалов, профессор  
Генеральный директор  
ООО «Колетекс»

28.01.2017г.

*Олтаржевская*  
Олтаржевская Наталия Дмитриевна

*Подпись А.Н. Проф. Олтаржевской Н.Д. Заверено  
Иск. ст. кадров Самойловой И.В.*

ООО «Колетекс»  
115093, Россия, г.Москва, ул. Павловская, д.21, н-п 4-6  
Тел./факс: (495) 730-56-45 многокан.  
E-mail: koletex@list.ru

