

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию Черногорцевой Марины Вячеславовны на тему: «Разработка полимерных материалов медико-биологического назначения на основе гиалуроновой кислоты и ее комплексов с хитозаном», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 05.17.06 – Технология и переработка полимеров и композитов

Диссертационная работа Черногорцевой М.В. посвящена созданию и изучению свойств новых композиционных материалов на основе биологически активных полисахаридов гиалуроновой кислоты и хитозана, предназначенных для использования в медико-биологических целях.

Актуальность темы диссертации. Разработке новых эффективных пленочных, гидрогелевых и волокнистых материалов медико-биологического назначения на основе биосовместимых полисахаридов в настоящее время посвящено значительное число исследований как у нас в стране, так и за рубежом. Для создания таких материалов особенно перспективными базовыми материалами признаны полисахариды, обладающие собственной биологической активностью. Объектами представленной диссертационной работы являются гиалуроновая кислота и хитозан – полисахариды, активно используемые в медицине в качестве носителей-пролонгаторов лекарственных препаратов, раневых покрытий. Кроме того, эти полисахариды представляют значительный интерес для использования в медицине и тканевой инженерии как базовый материал трехмерных подложек для выращивания клеток. Особенностью этих полисахаридов является их ионогенность, что создает необходимость изучения условий образования интерполиэлектrolитных комплексов в смешанных растворах и учитывать это явление при создании материалов на их основе. В связи с этим работа Черногорцевой М.В., посвященная исследованию свойств растворов выбранных полиэлектrolитов и закономерностей фазовых превращений в их

водных смесях с целью получения новых высокоэффективных материалов медико-биологического назначения, является *актуальной*.

Структура и объем работы. Задача исследования определена ясно и четко, содержание работы вполне соответствует поставленной задаче.

По своему объему и структуре диссертация соответствует общепринятым требованиям, она включает в себя введение, обзор литературы, экспериментальную часть, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы из 198 наименований. Работа изложена на 150 страницах машинописного текста и содержит 19 таблиц и 78 рисунков.

Работа написана хорошим языком, следует отметить грамотность в плане орфографии, построения предложений и использования научных терминов.

Во *введении* сформулированы актуальность темы работы, научная и практическая значимость, выбор объектов и методов исследования, цели и задачи.

В *литературном обзоре* всесторонне отражены последние достижения науки в области исследования физико-химических и биологических свойств гиалуроновой кислоты и хитозана, а также обсуждены наиболее эффективные методы их модификации и перспективные направления их применения в медицине и клеточных технологиях, рассмотрены теоретические основы метода электроформования нановолокнистых полимерных материалов. Литературные источники в целом подобраны удачно, из них порядка 50% относится к периоду последнего десятилетия.

В *главе 2* дана характеристика объектов исследования, вспомогательных материалов, подробно описаны методы получения и исследования свойств растворов, гидрогелей и волокон на основе использованных полисахаридов.

В *главе 3* «Результаты и их обсуждение» в целом хорошее впечатление производят вполне уместные ссылки на литературные источники, которыми сопровождаются все обсуждения экспериментального материала. Это, во-

первых, подкрепляет обоснованность выводов и, во-вторых, свидетельствует о глубокой проработке публикаций по данной тематике.

Раздел 3.1. посвящен изучению гидродинамических свойств и стабильности растворов гиалуроновой кислоты. Следует отметить, что в обсуждаемой работе исследования реологических свойств растворов ГК проводились не только для солевой формы полимера, но и для Н-формы. Причем, важно, что Н-форма получена с использованием ионообменной смолы (катионит) в отличие от основной части публикаций по исследованию влияния рН на вязкость ГК, когда перевод карбоксильных групп кислоты в протонированную форму осуществляли добавлением в раствор сильной кислоты, что неизбежно должно приводить к изменению ионной силы раствора. Это повышает научную ценность результатов. Методом титрования были установлены значения рН, гарантирующие 3 состояния ГК: 100% солевая форма (рН=6,5); степень нейтрализации 0,5 (рН=4,3) и 100% Н-форма (рН=3,5). Для этих трех форм ГК была исследована их устойчивость к гидролизу при длительном выдерживании растворов. Полученные результаты интересны для практического использования таких растворов.

В *разделе 3.1.2* описано получение гидрогелей ГК, ковалентно сшитых диглицидиловым эфиром 1,4 бутандиола, который традиционно используется в качестве кросслинкера для получения 3D-матриц на основе ГК. На основании сравнения степени набухания полученных гидрогелей установлено, что при осуществлении реакции в щелочной среде сшивка проходит более эффективно и позволяет получать упругие гидрогели (модуль упругости G' превышает модуль механических потерь G'' на 2 порядка).

В *разделе 3.1.3* рассмотрено получение и исследование матриц для выращивания клеток на основе гидрогелей гиалуроновой кислоты, сшитой диглицидиловым эфиром 1,4 бутандиола. Интересны эксперименты по введению гидроксиапатита в состав гидрогелей. Лиофильно высушенные матриксы были изучены методом конфокальной микроскопии. Данные цитосовместимости показывают, что жизнеспособность клеток в тестовых

системах была не высокой в случае гидрогелей без гидроксиапатита, в то время как при введении гидроксиапатита жизнеспособность клеток увеличивалась, что согласуется с результатами конфокальной микроскопии.

Особый интерес вызывает *раздел 3.1.4.*, посвященный электроформованию волокнистых материалов на основе гиалуроновой кислоты, т.к. известно, что этот полужесткоцепной полимер в воде образует очень вязкие растворы с высоким поверхностным натяжением. Поэтому для получения формовочных растворов была использована смесь растворителей NH_4OH :ДМФА. Поскольку полученный волокнисто-пленочный материал не удовлетворил автора, следующие эксперименты проводились при введении в раствор ГК гибкоцепного полимера (ПВС). При ознакомлении с этой частью работы можно себе представить, сколь обширный и трудоемкий эксперимент был выполнен автором по подбору характеристик компонентов и их соотношений, которые бы в итоге дали оптимальную композицию, пригодную для получения волокнистого материала методом электроформования. В таблице 7 просуммированы данные по влиянию ММ гиалуроновой кислоты и соотношения ПВС:ГК на пригодность композиции к электроформованию.

Раздел 3.2 посвящен исследованию закономерностей интерполимерного комплексообразования между противоположно заряженными полиэлектролитами – гиалуроновой кислотой и хитозаном и разработке новых материалов для медицины и тканевой инженерии на основе образующихся комплексов.

Особенности фазового разделения в водных смесях гиалуроновой кислотой с хитозаном рассмотрены в разделе 3.2.1. Здесь в качестве замечания можно заметить, что название раздела «Изучение закономерностей фазового разделения в системе гиалуроновая кислота – хитозан» не вполне отвечает его содержанию. В данном разделе представлены достаточно ценные данные о влиянии рН на вязкости растворов хитозана и гиалуроновой кислоты. Что же касается фазового

разделения в смесях, то здесь представлены лишь данные визуального наблюдения состояния смесей в виде фотографий различных смесей без указания состава. Гораздо более содержательным и в большей степени отражающим закономерности полиэлектролитного комплексообразования является *раздел 3.2.2.*, в котором приведены данные нефелометрического титрования и кондуктометрического титрования раствора хитозана эквимольным раствором ГК в Н-форме. В этом разделе определены условия (рН и ионная сила), при которых смесь полиэлектролитов остается гомогенной. По заявлению автора, это условия образования растворимого ПЭК. На мой взгляд, в установленных критических условиях комплексообразование между полимерами за счет кооперативного электростатического взаимодействия может вообще не иметь места.

Значительный интерес представляют результаты изучения процессов ковалентной сшивки хитозана в его смесях с гиалуроновой кислотой дженипином и глутаровым альдегидом и способности образующихся гидрогелей к набуханию (*разделы 3.2.3 и 3.2.4*). Безусловно, больший практический интерес вызывает использование менее токсичного сшивающего агента дженипина. Однако использование более химически активного глутарового альдегида позволяет осуществлять процесс при рН3, когда ГК присутствует в Н-форме, что интересно в теоретическом плане. Было исследовано влияние использования ГК в Н-форме, рН раствора и присутствия сильного электролита на гелеобразование в системах хитозан-ГК, сшитых с помощью глутарового альдегида и дженипина. В результате изучения кинетики набухания гидрогелей были получены кинетические кривые, которые имели вид кривых с областью насыщения, что свидетельствует о нерастворимости гидрогелей и их высокой к водоудерживающей способности.

Раздел 3.2.5 посвящен получению макропористых биodeградируемых матриц с использованием нерастворимых комплексов хитозана и гиалуроновой кислоты путем замораживания и последующей лиофильной

сушки. Автор применил два способа модификации хитозана гиалуроновой кислотой, основанных на интерполимерном полиэлектролитном комплексообразовании: 1 способ – поверхностная обработка сшитого хитозанового матрикса раствором ГК и 2 способ – матрикс на основе дисперсии полимеров, позволяющий более равномерно распределить ГК в объеме. Было установлено, что полученные материалы обладают системой сообщающихся пор размером 200-600 мкм, что позволяет их использовать в качестве матриксов для тканевой инженерии. Однако, как показали данные исследования цитотоксичности и процесса культивирования клеток (*раздел 3.2.6.*), *поверхностная* модификация хитозанового матрикса гиалуроновой кислотой *не* оказывала положительного эффекта на пролиферацию клеток в пористых матриксах, тогда как распределение ГК *в объеме матрикса* приводило к значительному увеличению количества жизнеспособных клеток.

Одной из решаемых в работе задач было получение нановолокнистых материалов на основе композиций полиэлектролитов гиалуроновой кислоты и хитозана. Поскольку попытки получить чисто полисахаридные нановолокна (*раздел 3.1.4.*) не увенчались успехом, в работе было предложено использовать для этой цели композиции, содержащие помимо полисахаридов гибкоцепной волокнообразующий полимер ПВС (*раздел 3.2.8.*). Безусловной заслугой автора является то, что благодаря использованию результатов обширного предшествующего эксперимента и анализу сложившихся теоретических представлений задача получения волокнистого материала, содержащего два биологически активных полисахарида, была решена. Были получены волокна и пленки наноскопических параметров и изучена их набухаемость в воде.

Очень интересным и содержательным является последний раздел работы (*раздел 3.2.9.*), посвященный послойному нанесению хитозана и ГК на шелковую нить. Были подобраны состав растворителя и концентрации полисахаридов, а также условия осуществления процесса. В качестве замечания можно отметить, что при подборе условий не обсуждался вопрос о

поверхностном заряде самой шелковой нити, обусловленный амфолитной природой волокнообразующего полимера фиброина. Тем не менее, желаемый результат был достигнут – получено качественное сплошное покрытие нити, что подтверждено данными по привесу нитей и их микрофотографиями.

Таким образом, проведенные исследования позволили разработать метод получения шовной нити, послойно модифицированной хитозаном, сшитым дженипином, и ГК-Na. Полученная шовная нить благодаря наличию в ее составе биосовместимых полимеров, обладающих собственной биологической активностью, может быть использована в хирургии.

Выводы по работе полностью отражают ее содержание. Автор выполнил значительное по объёму завершённое научное исследование. Полученные результаты им тщательно проанализированы, систематизированы и обобщены. Опубликованные работы в полном объёме раскрывают и передают содержание диссертации.

Личный вклад соискателя заключается в непосредственном участии на всех этапах работы: постановке цели и задач работы, планирования и проведении эксперимента, обсуждения и оформления полученных результатов.

Достоверность представленных в работе данных обеспечивается привлечением современных методов исследования и сопоставимостью полученных количественных характеристик с известными литературными данными.

Научная новизна работы обусловлена тем, что в ней получен ряд новых сведений по влиянию ряда варьируемых факторов (рН, ионной силы, состава растворителя и концентрации полимера) на гидродинамические свойства ГК в солевой и кислотной формах и способность этих форм к интерполимерному полиэлектролитному комплексообразованию с хитозаном. Исследованы особенности образования трехмерных матриц в системах ГК-хитозан-сшивающий агент.

Практическая значимость работы заключается в разработке на основе данных научного исследования методических подходов и приемов, которые могут служить основой для технологии получения разных типов материалов для хирургии, регенеративной медицины и тканевой инженерии на основе биологически активных полисахаридов гиалуроновой кислоты, хитозана и их интерполимерных полиэлектролитных комплексов. Установлено влияние введения osteoconductive компонента на структуру и пролиферацию клеток матрикса на основе сшитого гидрогеля гиалуроновой кислоты.

Основные результаты, полученные автором представляют интерес для специалистов, работающих в области создания материалов для новых медицинских технологий, и могут быть использованы рядом ведущих отечественных научно-исследовательских организаций и вузов (Российским химико-технологическим университетом им. Д.И. Менделеева, Институтом синтетических полимерных материалов имени Н.С. Ениколопова РАН, Институтом биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Федеральным исследовательским центром биотехнологии РАН).

Результаты диссертационной работы Черногорцевой М.В. докладывались на российских и зарубежных конференциях и изложены в 18 печатных работах, 6 из них опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, 3 – индексируются в Web of Science.

Научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертации, являются достаточно обоснованными и убедительно подтверждаются совокупностью экспериментальных данных.

Автореферат диссертации в целом отражает суть и выводы проделанной работы. Работа написана хорошим литературным языком, грамотно и аккуратно оформлена.

Диссертационная работа выполнена на высоком экспериментальном и научном уровне, однако имеются замечания.

Замечания.

1. В разделе 3.2.1, посвященном, судя по заголовку, изучению закономерностей фазового разделения в системе гиалуроновая кислота–хитозан, представлены данные визуального наблюдения за смесями в виде фотографий (рис.39), под которым следовало бы привести составы смесей в пронумерованных ячейках.

2. Не вполне понятен смысл эксперимента по электроформованию волокон из чистого ПВС разной ММ (таблица 6, стр. 82), в то время как задача состояла в получении волокон из смесей его с ГК, а это уже совсем другие растворы с другими характеристиками.

3. Стр. 87 в комментарии к рис. 38 резкое снижение вязкости раствора хитозана объяснено снижением степени диссоциации аминогрупп и (читаем) «...при $pH \geq 4,5$ начинается осаждение полимера». Вообще, согласно литературным данным, высаживание полимера начинается при более высоких значениях pH, а при $pH=4,5$ степень диссоциации аминогрупп близка к 100%. По-видимому, причина здесь в увеличении ионной силы.

4. Для доказательства образования ПЭК на поверхности шелковой нити при ее двуслойном покрытии хитозаном, сшитым дженипином, и раствором ГК-Na было проведено моделирование системы путем смешения компонентов в водном растворе. Такая модель является не вполне адекватной, т.к. не учитывает иммобилизацию хитозана на поверхности нити и его сшивку, что может создавать препятствия для комплексообразования с ГК. Доказательством образования ПЭК мог бы быть тест на отсутствие схода ГА в воде, но такой эксперимент не проводился.

Несущественные недочеты:

5. Стр.91, рис.41 в подрисуночной подписи нумерация кривых не соответствует нумерации на рисунке.

6. Неточности в использовании терминов: «влагопоглощение» (это адсорбция паров воды), там, где речь идет о набухании в воде, и

«влагоудерживающая способность» вместо «водоудерживающая» (стр. 98; 99, 100).

Изложенные замечания по диссертации не касаются ее существа и не портят общего положительного впечатления от работы.

Заключение. По результату рецензирования представленной к защите работы Черногорцевой Марины Вячеславовны можно сделать следующее заключение – диссертация является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена задача разработки методов регулирования свойств полимерных материалов на основе биополимеров гиалуроновой кислоты и хитозана и образующихся на их основе ИПЭК, имеющее важное значение для технологии переработки биополимеров.

Рецензируемая диссертационная работа по тематике, методам и объектам исследования, представленным, на защиту новым научным положениям соответствует паспорту заявленной специальности 05.17.06 - Технология и переработка полимеров и композитов в части формулы: п. 2 - Физико-химические основы технологии получения и переработки полимеров, композитов и изделий на их основе, включающие стадии синтеза полимеров и связующих, смешение и гомогенизацию композиций, изготовление заготовок или изделий, их последующей обработки с целью придания специфических свойств и формы; В части области исследований: п.2. - Полимерные материалы и изделия; пластмассы, волокна, каучуки, покрытия, клеи, компаунды, получение композиций, прогнозирование свойств, фазовые взаимодействия, исследования в направлении прогнозирования состав-свойства, гомогенизация композиции, процессы изготовления изделий (литье, формование, прессование, экструзия и т.д.), процессы, протекающие при этом, последующая обработка с целью придания специфических свойств, модификация, вулканизация каучуков, отверждение пластмасс, синтез сетчатых полимеров.

На основании изложенного, диссертационная работа Черногорцевой Марины Вячеславовны по актуальности, новизне, уровню выполнения,

объему, научной и практической ценности полученных результатов полностью отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в «Положении о порядке присуждения ученых степеней», утвержденном постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (пункты 9-14), а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата технических наук по специальности 05.17.06 – Технология и переработка полимеров и композитов.

Главный научный сотрудник
лаборатории химии и технологии
модифицированных волокнистых
материалов, д-р хим. наук
(специальность 05.19.02 –
Технология и первичная обработка
текстильных материалов и сырья),
профессор



Липатова Ирина
Михайловна



14.11.2019

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химии растворов им. Г.А. Крестова» Российской академии наук
Адрес: 153045 г.Иваново. ул. Академическая д. 1
Тел: (4932)-33- 62-61; email: i_lipatova@bk.ru