

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

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

Диссертационная работа М.В.Черногорцевой посвящена важной во все времена проблеме – созданию изделий для использования в медицинской практике для оказания помощи людям. Создание таких материалов всегда было актуальным, остается и будет оставаться таковым сегодня и в будущем. Автор решил для создания изделий для медицины использовать полимеры, созданные природой, а именно полисахариды хитозан и гиалуроновую кислоту. Это похвально т.к. кроме таких факторов как возобновляемость сырья и его экологическая безопасность, появляется возможность создавать изделия с оптимальными биологическими свойствами, со способностью положительно влиять на регенерацию и эпителизацию тканей, создавать материалы с комплексом новых ценных свойств, например, для тканевой инженерии, на модификацию используемых в медицине материалов, например, шовных нитей.

Таким образом, представленная диссертационная работа бесспорно актуальна, что дополнительно подтверждается выполнением ее в рамках госзадания МИНОБРНАУКИ РФ в соответствии с приоритетными направлениями развития науки в Российской Федерации.

Научная новизна работы не вызывает сомнений, т.к. в ней представлено много новых, впервые полученных и доказанных фактов, касающихся поведения изучаемых биополимеров - гиалуроновой кислоты (ГК) и хитозана и интерполимерных комплексов на их основе (ИПК). Например, показана взаимосвязь гидродинамических свойств и степени нейтрализации ГК, влияние ионной силы на процесс комплексообразования в растворах хитозана и ГК, особенности гелеобразования в водных растворах хитозана при введении сшивающих агентов. Полученные закономерности позволили автору подойти к научному обоснованию технологии получения гидрогелей с заданными свойствами, к процессу управления структурными осмотическими и другими параметрами, определяющими свойства биоматериалов.

Сказанное выше говорит о теоретической значимости диссертационного исследования. Практическая значимость работы связана как с разработкой

принципов и параметров (технологических, физико-химических), необходимых для построения технологического процесса, так и с предлагаемыми технологическими решениями по созданию матриц для роста клеток в регенеративной медицине и биоинженерии и модификации готового материала из природного белкового полимера фиброин (натурального шелка) с целью улучшения его свойств. Достоверность результатов не вызывает сомнения т.к. они получены при использовании современных методов анализа, в том числе атомно-силовой, оптической, конфокальной, лазерной и сканирующей электронной микроскопии, с применением необходимых для данного исследования «классических» методов – вискозиметрии, кондуктометрии, нефелометрии и др.; получены экспериментальные данные и выводы из них представлены научной общественности и апробированы путем публикаций и докладов на многих отечественных и международных конференциях.

По нашему мнению, самая интересная, современная, актуальная часть работы диссертанта – это создание биополимерных матриц на основе гидрогелей-гиалуроновой кислоты и гидроксиапатита для регенерации костной ткани и биополимерных матриксов на основе гидрогелей хитозана, сшитого дженипином, содержащих интерполимерные комплексы с гиалуроновой кислотой. Следует приветствовать выполнение этих очень важных в научном и практическом смысле работ.

Диссертация написана в классическом стиле: литобзор, методическая и экспериментальная часть, из которой следуют выводы. Работа изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 78 рисунков, 19 таблиц. Список литературы включает 198 библиографических и электронных источников. Литературный обзор построен логично, исходя из целей работы. В работе изучается два полимера - гиалуроновая кислота и хитозан, но большее внимание уделено ГК, так как в заглавии диссертации речь идет о полимерных материалах на основе гиалуроновой кислоты и ее комплексов с хитозаном, т.е. роль последнего как бы менее значима (только в комплексе с ГК). Соответственно рассматриваются отдельно необходимые, значимые для диссертационного исследования свойства ГК, затем-хитозана, затем – методы получения на их основе материалов для медицины (электроформование как технология получения материалов и особенности получения матриксов из растворов изучаемых полисахаридов, технологии использования полиэлектролитных комплексов на основе хитозана и ГК).

Литературный обзор большой, он занимает ровно половину диссертационной работы. Написан грамотно, интересно, хорошо оформлен.

Сопровождается очень большим количеством использованных литературных источников (198), преимущественно на иностранном языке. Такой объем литературного обзора характеризует диссертанта как работоспособного, вдумчивого, заинтересованного в своем деле и результате исследования, который детально подходит к нахождению и изучению литературных источников и оценке описанных в них экспериментальных данных, касающихся его работы. Интересны приведенные в начале обзора данные по полимерным материалам, используемым в регенеративной медицине и тканевой инженерии, которые показывают важность поставленных в работе задач, хотя порой в тексте явно прослеживаются «общие места», не имеющие прямого отношения к исследованию. Описание свойств гиалуроновой кислоты и ее строения носит хрестоматийный характер, как и в случае хитозана, однако затем автору удается «перекинуть мостик» к данным, имеющим прямое отношение к исследованию.

В тексте литобзора (с.17) указано, что при введении ГК в организм под действием ферментов и свободных радикалов происходит биодеструкция ГК с образованием низкомолекулярных фрагментов и олигосахаридов, которые, в т.ч. позволяют использовать данный полимер в качестве носителя для замедленного высвобождения веществ. В связи с отсутствием ссылки желательно пояснить, что подразумевается под замедленным высвобождением веществ (каких?).

Логично обосновано использование нановолоконных материалов, полученных электроформованием, в качестве временного внеклеточного матрикса (скаффолда), который может использоваться как трехмерная структура для прикрепления и роста клеток и имплантироваться в пораженный участок ткани организма, и выбор для создания таких матриксов полимеров природного происхождения, в частности полисахаридов ГК и хитозана.

Подробно объяснена необходимость сшивки полимерных цепей у сформированных нановолокон для определенных областей медицинского применения (например, регенеративной медицины) с целью достижения (в силу набухания и растворения) структурной целостности матрикса, дано много примеров, в которых использованы разные, порой экзотические растворители и сшивающие агенты. Подробные обоснования необходимости использования химической сшивки приведены и при рассмотрении для получения матрикса ГК, имеющей высокую скорость деградации.

В целом автор убеждает читателя на основании большого экспериментального материала, представленного в диссертации, в сложности использования основной из выбранных им технологии, а именно,

электроформования нетканых волокнистых материалов из индивидуальных растворов полисахаридов, и в еще больших трудностях получения биополимерного матрикса при использовании полиэлектролитного комплекса (ПЭК) в данном случае – слабой поликислоты (ГК) и слабого основания (хитозан). В этом случае внимание так же уделено анализу литературы по использованию сшивающих реагентов, позволяющих изменяя степень сшивки, контролировать степень набухания и скорость деградации матрикса хитозан-ГК, т.е. создавать лечебный материал с заранее заданными свойствами, в частности, для регенеративной медицины. Следует отметить, что часть обзора, касающаяся получения и использования полиэлектролитных комплексов, написана наиболее четко и аргументированно.

В литературном обзоре приведено очень много интересных, но экзотических и к настоящему времени технологически недостижимых способов воздействия на ГК как в виде матриксов, так и волокон (например, перевод ГК в нерастворимое состояние при формировании нановолокон, использование муравьиной кислоты и др.) То же можно отнести к получению волокон из хитозана по сложной технологической схеме и необходимостью – как выход из этой ситуации с целью технологического воплощения – использование при электроформовании дополнительных полимеров (у диссертанта – поливинилового спирта). Важно, что автор диссертации, глубоко изучив литературу, не скрывает существующие проблемы, а, придерживаясь тезиса о целесообразности применения изучаемых полимеров – полисахаридов в медицине благодаря их биосовместимости, ранозаживляющим и другим важным свойствам, продолжает искать новые пути для реализации технологических решений. Возможно, подробное описание существующих весьма сложных и нетехнологичных способов можно было сократить или даже исключить без ущерба для литературного обзора, т.к. им сопутствуют однозначные выводы диссертанта о неприменимости, однако, научная значимость этих экспериментов и безусловный научный интерес диссертанта – исследователя повлияли на их включение в работу, что, бесспорно прерогатива ее автора, хотя и несколько перегружает текст.

Экспериментальная часть начинается с тезиса о необходимости повышения биосовместимости материалов медицинского назначения, для чего диссертант (и другие исследователи) должны разработать технологии, исключаящие применение токсичных (и подобных) соединений. Это не совсем удачная трактовка цели работы (она не совпадает с приведенной), т.к. в работе используются биосовместимые материалы, и это их главное свойство известно

заранее. Речь идет скорее о создании изделий на их основе по максимально экологичной технологии.

На высоком уровне выполнена часть работы, касающаяся изучения гидродинамических свойств и стабильности растворов гиалуроновой кислоты. Она позволяет говорить о диссертанте как об исследователе, способном к глубокому анализу получаемых химических результатов. Автор обосновано изучает стабильность вязкостных свойств гиалуроновой кислоты и ее натриевой соли во времени и ее зависимость от pH. Это необходимо для построения технологического процесса, определения времени хранения и т.д. Диссертант получает интересные неожиданные результаты и пытается дать им научное объяснение. Однако, ни одной литературной ссылки, подтверждающей (или опровергающей) сделанные предположения о механизме падения вязкости, не приводится. (гл.3.1.1) Высоко оценивая эту часть работы, хотелось бы получить более четкий вывод, необходимый для построения технологического процесса: длительное хранение ГК (в Н-форме) – это какое время? Рекомендации использовать только свежеприготовленные растворы для получения полиэлектrolитных комплексов с хитозаном предполагают их применение сразу после приготовления или их можно какое-то время хранить? Это важно в технологическом плане.

Исходя из современных направлений развития науки, важна часть работы, посвященная созданию и исследованию биополимерных матриц на основе ГК, сшитых БДДЕ, для выращивания клеток. Интересен материал, связанный с созданием матриксов для культивирования клеток. Их получали путем лиофильной сушки гидрогелей ГК, сшитых БДДЕ в различных концентрациях. В этой системе сшивающий агент имеет ключевое значение с точки зрения получения пор и их размера. Если ГК как биополимер благоприятна для жизни клеток, то роль БДДЕ (не как порообразователя, а как химического реагента) вызывает вопросы с точки зрения жизнеспособности клеток и токсического воздействия. Из литературы известно, что в случае введения гидроксиапатита результаты выращивания клеток остеосаркомы человека и мышинных фибробластов лучше, жизнеспособность выше, особенно для фибробластов. (Например, работы по использованию коллаген-гидроксиапатитовых имплантов). Автор в своем исследовании именно гидроксиапатиту отводит в этом главную роль. Использование гидроксиапатита как «спасательного круга» понятно, обосновано, помогает повысить жизнеспособность клеток, но это действие именно этого компонента. Вероятно, эти интересные исследования требуют дальнейшего изучения и, возможно, выбора другого сшивающего

агента, положительно влияющего на биосовместимость. Как пожелание, очень интересно было бы оценить размер пор матрикса ГК, площадь их поверхности, сшитой в том числе БДДЕ. Это очень важно было бы для дальнейшего продвижения исследований в этой части работы.

Оценивая данные, полученные диссертантом при изучении возможности применения электроформования при получении нановолокон из растворов ГК, поиск растворителей для электроформования, следует отметить объективность автора при оценке результатов. Исходя из понимания, что отрицательный результат - это тоже результат и он способствует продвижению научных поисков, полученные данные важны, имеют научную ценность. Вопрос о включении ПВС как жесткоцепного волокнообразующего компонента и создании с его помощью формовочных растворов дискуссионен, в т.ч. в плане использования создаваемых материалов в медицине, где ПВС несмотря на его применимость в этой области не всегда дает хорошие результаты.

Интересна часть по изучению взаимодействий в системе ГК-хитозан, зависимости вязкости от pH и сочетания полимеров. Эта часть, выполненная на хорошем научном физико-химическом уровне, бесспорно при дальнейшей проработке будет значима и в технологическом плане.

Следует отметить, что результаты, связанные с образованием полиэлектролитных комплексов (ПЭК) хитозан-ГК, с условиями гелеобразования в этих системах наиболее хорошо проработаны и интересны, хотя с практической точки зрения выбор для достижения химической сшивки (в медицинских изделиях) таких реагентов как глутаровый альдегид и дженипин не вполне оправдан. Может, есть смысл попробовать другие? Можно принять соображения автора о роли аминогрупп хитозана в скорости гелеобразования и рассматривается это как способ управления процессом за счет варьирования состава композиции.

С научной и практической точек зрения важны результаты по получению макропористых матриксов на основе комплексов ГК – хитозан для введения в них клеток. Это современная бурно развивающаяся тематика, и очень хорошо, что диссертант принял в ней участие и получил интересные результаты. Автор предлагает технологию получения пористых материалов с различными характеристиками и показателями, что будет влиять на степень адгезии вводимых клеток и рост. Рассматриваются два способа образования полиэлектролитного комплекса ГК – хитозан: на поверхности пористого матрикса и путем диспергирования водного раствора гиалуроната натрия в растворе хитозана, содержащего сшивающий агент. Методом конфокальной

микроскопии автором изучена морфология этих материалов и установлена их пористая структура с системой сообщающихся пор размером 200-600 мкм. Это важный результат, т.к. подобные матрицы можно успешно использовать в тканевой инженерии, бурно развиваемой в России и других странах. Эта часть работы бесспорно должна иметь практическое продолжение. Тот факт, что исследование способа получения матрикса достоверно показало целесообразность распределения ГК по всему объему и увеличение при этом числа жизнеспособных клеток, является важным реальным выводом из представленной диссертации.

Наиболее технологически проработанным и практически значимым разделом диссертации является модификация хирургической шовной нити из натурального шелка путем нанесения на нее «рубашки» из хитозана и его ПЭК с ГК. О технологичности этого процесса можно говорить, учитывая предлагаемую схему опытной установки по модификации нитей, представленную диссертантом. Однако, положительно оценивая научную проработку рассматриваемого способа модификации шовной нити и понимая принципиальную возможность и в ряде случаев целесообразность создания на нити рубашки, все же не до конца понятен выбор полимера – основы нити. Хирургические нити из натурального шелка всегда считались прекрасным материалом, природным, состоящим только из белка фиброина, т.к. при операции обесклеивания обязательно удаляли второй белок-серицин. Автор указывает, что серицин вызывает аллергическую реакцию. Свойства этой нити изучались и проверены годами использования, в т.ч. ее антиаллергенность. Почему именно эту нить диссертант решил модифицировать? Создание на нити малорастворимой рубашки (или нерастворимой) не объясняет улучшения свойств нити. Какова роль биополимеров ГК и хитозана, наносимых на нить, в улучшении ее свойств (каких?) как рубашка будет влиять на качество узла при использовании – не ясно. Нанесение сшитого хитозана и его полиэлектролитных комплексов с ГК на шелковую нить увеличивает ее толщину (за счет привеса композиции) на 10-12%. Как это будет сказываться на технике ушивания послеоперационных ран, качестве швов и формировании узлов? Для каких нитей (какие NN нитей) целесообразна такая обработка? Вероятно, речь идет о нитях «толстых», NN 1-4, т.к. у «тонких» (NN 6-7), например, используемых в офтальмологии, это мало применимо. Учитывая, что сегодня шовные нити выпускаются главным образом с иглой и в таком (готовом) виде подвергаются обязательной стерилизации, следует продумать, на какой из стадий технологического процесса на нить будет наноситься

полимерная композиция, как, каким способом после этого нить следует стерилизовать и что будет происходить с полимерной рубашкой, с ПЭК ГК-хитозан при стерилизации. Эти моменты следует уточнить при разработке технологического процесса модификации шовного материала из природного биополимера.

В целом положительно оценивая выполненную диссертационную работу, ее большой объем и ценный экспериментальный материал, следует отметить, что обилие материала, порой, разнопланового, не могло не привести к некоторой фрагментарности работы. На «дереве цели», висит много разных подарков и игрушек, впрочем, объединенных тремя ключевыми элементами: биополимерами хитозан, гиалуроновая кислота и ПЭК на их основе, а так же технологиями получения из них изделий для медицины. Цель работы в большей степени соответствовала бы названию диссертации, т.к. ГК и хитозан – это не полимерные материалы, а полимеры, их делает природа. Как положительный факт стоит отметить, что автор в результате работы создает именно полимерные изделия для медицины, решая важную научную и практическую задачу, что, как сказано выше, возможно не совсем совпадает с названием диссертации «Разработка полимерных материалов» (их разработала природа). Хотя этот вопрос можно считать дискуссионным и скорее лингвистически значимым, и не столь важным для работ в области химии и переработки полимеров.

Следует отметить не всегда достаточно четкое формулирование позиций автора. Например, в объектах исследования указаны в том числе «методы получения материалов медико-биологического назначения», в предмете исследования – «научное обоснование методов получения материалов на основе...», цель работы – разработка методов получения и модификации материалов медико-биологического назначения...». В тексте указывается, что автором изучены реологические и гидродинамические свойства, например, водных растворов Н-формы ГК. Очевидно, под реологическим параметром понимается вязкость (вязкостные свойства как часть реологических), хотелось бы четче определиться, что рассматривается в данном случае как гидродинамические свойства.

Хотелось бы уточнить, если ГК и хитозан образуют ИПЭК, то для каких случаев в комплекс (ИПЭК) хитозан - ГК предполагается (необходимо) дополнительно вводить сшивающие агенты, всегда ли и зачем это нужно. Во всех случаях это сильно осложняет технологию, ее реализацию, особенно при использовании «экзотических» сшивающих агентов. Например, автор получает

гидрогели ИПЭК в форме гранул, но его не устраивает стабильность системы. Принципиально возможно ли ее менять без сшивающих агентов? Можно, вводя NaCl, хотя пока технологически это очень сложно.

Диссертант в главе 2 пишет о получении пористых матриц на основе сшитых гидрогелей гиалуроновой кислоты, говоря о полученных гидрогелях как о синтезированных. О каком синтезе идет речь? Диссертант отмечает среди решенных задач, что «оптимизированы составы биodeградируемых пористых материалов», не объясняя четко, в чем заключалась оптимизация, какие параметры обоснованы как оптимальные, что и почему является оптимальным. Может лучше «эффективные соотношения»? То же касается «оптимальных биологических свойств (гл.3) создаваемых материалов. Какие свойства в этом случае автор считает оптимальным? Эти неточности в работе не умаляют ее достоинств, они возникают при внимательном прочтении и связаны с большой разноплановостью и объемом диссертационного исследования, вызывающего профессиональный интерес.

Подытоживая сказанное выше, учитывая высокий научный уровень диссертации и интерес, в том числе практический, возникающий при ее прочтении и анализе, следует сделать основные замечания; они не носят принципиального характера, а ставят своей целью помочь автору в его дальнейшей работе, заострив внимание на некоторых возникающих вопросах.

1. Автор использует два природных биополимера – полисахарида – хитозан и гиалуроновую кислоту. Оба обладают хорошо известными ценными свойствами, определяющими их использование в медицине. Какие новые свойства хотел получить диссертант, объединяя два биополимера? Достиг ли он своей цели? Есть ли доказательство тому, что полученный при их соединении материал получил новые (лучшие, или не потерял имеющиеся) свойства? О каких «оптимальных биологических свойствах» идет речь в работе?
2. Где предполагается использовать рассматриваемые полимерные материалы после сшивки с учетом потери биodeградации?
3. Хорошо бы определить пористость матрицы ГК, сшитых БДДЕ. Это важно для их использования. Интересно узнать мнение диссертанта о механизме создания контролируемой пористости композита и роли в этом процессе лиофильной сушки.

4. Желательно пояснить указанный факт возникновения сшивки при введении сшивающего агента по аминок группам хитозана, а не по –ОН группам.
5. Желательно пояснить супернабухаемость сшитой ГК и роль степени сшивки в этом процессе, влияние этого фактора на технологию.
6. Следует пояснить выбор шелковой нити как объекта для модификации с помощью полимеров и ПЭК. Рассматривал ли диссертант вопрос биodeградации шовного модифицированного материала, возможные изменения свойств после его обязательной стерилизации и технологичность его использования (качество нити, узлов).

Основные результаты, полученные автором представляют интерес для специалистов, работающих в области разработки материалов медицинского назначения, и могут быть использованы рядом ведущих отечественных научно-исследовательских организаций (ИСПМ РАН имени Н.С. Ениколопова, ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН, РХТУ им. Д.И. Менделеева, Федеральным исследовательским центром биотехнологии РАН).

Основные положения диссертационной работы опубликованы в 18 печатных работах, из которых 6 – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, 3 – индексируются в WEB of Science.

Автореферат диссертации в целом отражает суть и выводы проделанной работы. Работа аккуратно оформлена, написана хорошим языком, грамотно, и мелкие погрешности не влияют на это мнение, и отвечает высокому уровню и требованиям к научным исследованиям.

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.

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 получения новых материалов на основе полисахаридов гиалуроновой кислоты и хитозана, а также образующихся на их основе ИПК, имеющая важное значение для развития технологии переработки природных полимеров.

По актуальности, новизне, уровню выполнения, объему, научной и практической ценности полученных результатов диссертация 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 заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата технических наук по специальности 05.17.06 – Технология и переработка полимеров и композитов.

Генеральный директор ООО

«Колетекс», д-р техн.наук

(специальность 05.19.03 -

Технология текстильных

материалов), профессор

Н.О. Селезнёв

Олтаржевская Наталия

Дмитриевна

Подпись руки Олтаржевской Н.Д.

*Заверено пог. о.к.
20.11.19*



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