

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Сажнева Никиты Александровича

на тему: «Разработка методов модификации и переработки фиброина в волокнистые материалы и гидрогели медико-биологического назначения»,
представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук

Диссертационная работа Сажнева Н.А. посвящена **актуальной** проблеме – разработке новых материалов на основе природных полимеров, перспективных для использования в различных областях: медицине, фармацевтике, тканевой инженерии, защите окружающей среды. Такие материалы могут быть получены в виде микрокапсул, пленок, нано- и микроволокон, гидрогелей, скаффолдов и т.п. Производство биополимерных материалов включает в себя комплекс специальных приемов, которые используются для придания готовому материалу необходимых эксплуатационных свойств, включая регулируемое водопоглощение, прочность, сорбционные свойства и биологическую активность. Полисахариды и белки, которые способны имитировать естественную среду организма, обеспечивают материалу подходящие условия для адгезии и пролиферации клеток и регенерации тканей.

В диссертационной работе с целью получения биоразлагаемых полимерных матриц для регенерации тканей Н.А. Сажнев использует криотехнологии, электроспиннинг и коагуляционное формование волокон, а в качестве биodeградируемого полимерного сырья – белок фиброин, регенерированный из коконов тутового шелкопряда, и аминополисахарид хитозан. Однако автор сталкивается с проблемой: полученные из регенерированного фиброина материалы растворимы в воде. Соискателем предложены два возможных метода предотвращения растворимости материалов: химическое сшивание, которое может быть недостаточно эффективным для выбранного белка, и конформационный переход фиброина. В первом случае предлагается использование нетоксичного сшивающего

реагента дженипина, который, в особенности при добавлении аминоксодержащего полисахарида хитозана, способен химически сшивать биополимеры и способствовать образованию полимерной сетки. Другой метод основан на реализации условий перехода фиброина из растворимой в воде формы в нерастворимую β -складчатую конформацию.

Структура и объем работы. Цель и задачи диссертационного исследования Н.А. Сажнева сформулированы четко. Текст работы содержит последовательное описание способов, которые соискатель использует для решения поставленных задач.

По объему и структуре диссертация соответствует всем общепринятым требованиям: включает в себя введение, литературный обзор, экспериментальную часть, результаты и их обсуждение, заключение, выводы по выполненной работе и список цитируемой литературы из 160 источников. Работа изложена на 152 страницах машинописного текста и содержит 16 таблиц и 64 рисунка.

Во введении сформулированы основные аспекты работы, актуальность темы, выбор объектов и методов исследования, цели и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость.

В обзоре литературы отражены особенности строения белка фиброина и методы получения его растворов, описаны условия конформационных переходов в биополимере, гелеобразование под действием различных факторов. Автор так же акцентирует внимание на процессе электроформования из растворов белка, затрагивает другие инновационные способы переработки биополимеров, такие как 3D-принтирование. Часть литературного обзора посвящена применению получаемых материалов в биомедицине и тканевой инженерии. Проанализированная литература включает актуальные источники, большая часть которых — это статьи в ведущих мировых научных журналах.

В главе 2, посвященной объектам и методам исследований, описаны характеристики основного сырья и вспомогательных материалов, подробно

изложены методы получения и исследования свойств растворов из фиброина и его композиций с хитозаном, а также материалов на их основе.

Глава 3 «Результаты и их обсуждение» - это основная часть работы. Она посвящена обсуждению полученных автором экспериментальных данных. Рассмотрение основных результатов в тексте работы сопровождается ссылками на литературные источники, что свидетельствует об обоснованности выводов, которые делает автор. Экспериментальная часть логично выстроена и разделена на 6 основных разделов, при этом результаты и выводы по каждому разделу подводят к следующей части работы.

Раздел 3.1 описывает основные технологические операции выделения фиброина из коконов тутового шелкопряда: способы очистки шелка от загрязнителей и серицина; анализируется процесс растворения фиброина и обосновывается состав подходящей для этого системы. Обоснованы оптимальные условия, которые обеспечивают получение гомогенных растворов фиброина (растворитель – 9М бромид лития, концентрация шелка-сырца до 10%). Результаты изучения реологических свойств водных растворов фиброина в широком диапазоне концентраций: от 0,2 до 40 % позволяет выбрать как условия получения растворов, так и оптимальные составы формовочных композиций.

Раздел 3.2 посвящен проблеме растворимости фиброина в воде и методам его перевода в нерастворимое состояние. Показано, что нерастворимая в воде β -складчатая структура образуется в результате перераспределения водородных связей. Опираясь на литературные данные, Сажнев Н.А. для контроля конформационного перехода в пленках из фиброина использует водные растворы этанола. Структурные изменения в порошках фиброина, вызванные прямой обработкой этанолом были убедительно подтверждены нефелометрическими исследованиями и методом ИК-Фурье спектроскопии. Важно отметить, что полученные автором данные не противоречат описанным в литературных источниках.

Другой способ получения не растворимых в воде материалов на основе биополимеров, рассматриваемый Сажневым Н.А. – это химическая сшивка. Как показано в диссертации - время гелеобразования в 2%-ном растворе фиброина даже при высоком содержании дженипина и рН 7,2 намного выше, чем в эквиконцентрированном растворе полисахарида хитозана и составляет несколько суток. С использованием спектроскопии установлены особенности механизма взаимодействия фиброина с дженипином по сравнению с хитозаном. Показано, что скорость гелеобразования в растворах фиброина значительно ниже, чем в растворах хитозана. Обнаружено, что перед формированием пространственной сетки в процессе сшивки дженипином происходит изменение цвета раствора до зеленого или голубого (в зависимости от концентрации раствора), что может служить индикатором возможности проведения процесса формования в условиях, предшествующих резкому росту вязкости.

Автором был предложен метод определения физико-механических свойств элементарных волокон фиброина с использованием АСМ, который позволяет визуализировать топографию отдельно взятого волокна и одновременно проводить физико-механические исследования. Определены силы адгезии к поверхности волокна и волокна к подложке. Проанализировано влияние состава формовочной смеси и количества сшивающего реагента на физико-механические свойства сформованных волокон из биополимеров.

Автор получал и другие пористые материалы на основе фиброина – при помощи лиофильного высушивания водных растворов с концентрацией 10 и 20%. После лиофильной сушки, Сажнев Н.А. обрабатывал образцы раствором сшивающего реагента в этаноле и получал таким образом сшитые дженипином криоструктураты с системой взаимопроникающих пор, размер которых можно изменять, меняя концентрацию растворов биополимеров.

В разделе 3.4 показана возможность получения материалов на основе смешанных растворов фиброина и хитозана и исследованы их свойства. С

использованием флуоресцентной метки установлены особенности пролонгированного высвобождения из гидрогелевых материалов иммобилизованного комплекса противовоспалительных и антибактериальных пептидов и белков, секретируемых стволовыми клетками. Установлено образование ПЭК в растворах фиброина и хитозана. Показана возможность управления индукционным периодом сшивки путем изменения композиционного состава.

В разделе 3.5 приведены результаты разработки биополимерных материалов на основе хитозана и фиброина: биологически-активных пленок, содержащих различные лекарственные соединения или белково-пептидный препарат, нановолокнистые материалы, моноволокна и крупнопористые криоструктураты. Разработан метод предотвращения растворимости материалов из биополимеров в воде, совмещающий сшивку дженипином и обработку этанолом.

Раздел 3.6 посвящен изучению биосовместимости и перспектив использования материалов на основе фиброина и хитозана. Для получения матриц, скаффолдов для тканевой инженерии использованы материалы различного состава: электроформованные волокнистые материалы из фиброина и его смесей с хитозаном, криоструктураты из фиброина, криоструктураты из хитозана, и криоструктураты из смесей хитозана и фиброина, модифицированные химической сшивкой дженипином в спиртовой среде. Все полученные в работе материалы способствовали пролиферации живых клеток, однако наибольшей биологической активностью обладают материалы, в составе которых соотношение фиброин/хитозан – 1:1. С использованием флуоресцентной метки установлены особенности пролонгированного высвобождения из гидрогелевых материалов иммобилизованного комплекса противовоспалительных и антибактериальных пептидов и белков, секретируемых стволовыми клетками. Установлено, что изменение

концентрации дженипина позволяет регулировать фармако-кинетические свойства хитозан-фиброиновых пленок.

Таким образом, в соответствии с целью и задачами исследования, автором была проделана большая комплексная работа, которая включает в себя разработку новых процессов получения биополимерных материалов для использования в тканевой инженерии.

Достоверность результатов. Результаты получены при использовании взаимодополняющих современных методов исследований, в том числе атомно-силовой микроскопии, СЭМ, ИК-Фурье спектроскопии, с применением стандартных методов - вискозиметрии, нефелометрии и т.д., получены экспериментальные данные и выводы из них апробированы путем публикаций и докладов на многих отечественных и международных конференциях.

Основные положения диссертационной работы Сажнева Н.А. изложены в 24 печатных работах, 7 из них опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Научная новизна работы заключается в установлении новых особенности механизма взаимодействия биополимеров фиброина и хитозана с дженипином и гелеобразования в их растворах, с выявлением продолжительного индукционного периода роста вязкости и интенсивности поглощения при 610 нм, что обуславливает образование пространственной сетки сшитых биополимеров, и использовании этого факта для реализации технологических приемов формования волокон.

Теоретическая значимость работы в установлении роли конформационных переходов белка фиброина и структурообразования в его смешанных растворах с хитозаном при формировании не растворимых в воде композиционных волокон и гидрогелей.

Практическая значимость заключается в разработке методов получения волокнистых и гидрогелевых материалов на основе белка фиброина и его смесей с хитозаном, перспективных для применения в

качестве биополимерных материалов для тканевой инженерии, а также систем с контролируемым высвобождением лекарственных соединений. Автором разработан способ получения биodeградируемых криоструктуратов с достаточно высокой влагоудерживающей способностью и регулируемым размером пор, и показана их эффективность как подложек для культивирования животных клеток.

По работе имеются некоторые замечания.

1. Желательно было более полно охарактеризовать использованный хитозан. В частности, желательно было бы определить его индекс полидисперсности с помощью ВЭЖХ.

2. Не на всех рисунках в работе приведены доверительные интервалы.

3. На стр. 37 даны ссылки №114-116 (2005, 2008, 2002 г.), на мой взгляд это устаревшая информация и имеются более современные обзоры.

Заключение. Однако указанные замечания не влияют на общее положительное мнение по работе Сажнева Никиты Александровича. Диссертация является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена задача разработки новых материалов на основе растворов фиброина и его смесей с хитозаном, имеющая значение для развития физико-химических основ переработки биополимеров.

Рассмотренные в диссертации вопросы соответствуют областям исследований, включенных в паспорт специальности 05.17.06 - «Технология и переработка полимеров, и композитов», а именно 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.

По актуальности, новизне, уровню выполнения, объему, научной и практической ценности полученных результатов диссертационная работа отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям

(пункты 9-14 «Положение о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.).

Соискатель Сажнев Никита Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 05.17.06 - «Технология и переработка полимеров и композитов».

Главный научный сотрудник
лаборатории инженерии
биополимеров Института
биоинженерии им. К.Г. Скрябина
Федерального исследовательского
центра «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН, доктор
химических наук, профессор

Варламов Валерий Петрович

10 мая 2022 г.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук»

119071 г. Москва, ул. Ленинский проспект, дом 33, стр. 2

Тел. +7(499)135-65-56

E-mail: varlamov@biengi.ac.ru

Варламова В.П.



И.Н. Шица

И.Н. Шица