

ОТЗЫВ

официального оппонента Сивцова Евгения Викторовича
на диссертацию Бардаковой Ксении Николаевны на тему: «Влияние структуры и физико-механических свойств трехмерных биodeградируемых полимерных материалов на их биосовместимость и клеточную адгезию», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.7 – Высокомолекулярные соединения.

Формирование персонализированных материалов биомедицинского назначения или трехмерных конструкций сложной архитектоники является одной из ключевых задач современной регенеративной медицины и подразумевает комплексную междисциплинарную работу по целому ряду направлений.

Диссертационная работа Бардаковой К.Н. посвящена разработке новых фотополимеризующихся композиций (ФПК) на основе природных и синтетических биodeградируемых полимеров, их последующему структурированию методами лазерной стереолитографии и комплексному исследованию свойств сформированных материалов биомедицинского назначения, в том числе после этапа их пост-обработки в среде сверхкритического диоксида углерода (scCO_2) и лазерно-индуцированного нанесения полимерных шаблонов различной геометрии.

В качестве основных компонентов ФПК в диссертации выбраны четыре биodeградируемых полимера – хитозан, коллаген, полилактид и полиэтиленоксид. Природные полимеры – хитозан и коллаген – обладают уникальным набором биологических и физико-химических свойств за счет чего широко применяются для создания материалов биомедицинского назначения в форме пленок, волокон, микрогранул; их используют в качестве носителей различных типов клеток и факторов роста, в доставке лекарств.

Однако, во-первых, природные полимеры зачастую демонстрируют низкие механические характеристики, обладают высокой скоростью деградации, тогда как использование их в смеси с синтетическими полимерами позволяет значительно улучшить свойства материала биомедицинского назначения, добиться того, чтобы физико-механические свойства трехмерных структур были сопоставимы со свойствами замещаемой ткани. В связи с этим, в диссертации для преодоления указанных недостатков использовали смеси хитозана с диакрилатом полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДА), а для упрочнения коллагеновых биоматериалов – фоточувствительный разветвленный полилактид.

Во-вторых, в случае травм и повреждений сложной геометрии актуальны методы получения трехмерных конструкций, которые полностью повторяют форму дефекта пациента. В качестве методов изготовления подобных конструкций особого внимания заслуживают однофотонная и двухфотонная лазерная стереолитография, с помощью которых получают трехмерные конструкции с необходимыми пористостью и шероховатостью. Для масштабирования методов лазерной стереолитографии в регенеративной медицине, как правило, требуется разработка широкой номенклатуры биосовместимых ФПК, что и явилось одной из задач диссертационной работы.

Наконец, в-третьих, важным этапом для улучшения биосовместимости и контроля клеточного поведения, а именно регулирования степени адгезии и направления клеточного роста, является пост-обработка полимерных биоматериалов различными методами. В диссертации сформированные биоматериалы обрабатывали в скСО_2 , также был разработан комбинированный подход (УФ-сшивание и лазерно-индуцированное нанесение армирующих шаблонов из полилактида) для создания определенного пространственного расположения клеток и упрочнения коллагеновых биоматериалов.

Решению обозначенных проблем посвящена диссертация Бардаковой К.Н., что определяет ее актуальность и практическую значимость.

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, методической части, описания и обсуждения результатов, заключения, списков цитируемой литературы, терминов и сокращений, приложений. Работа изложена на 177 страницах, содержит 66 рисунков, 9 таблиц, 16 приложений и 338 библиографических ссылок.

В литературном обзоре (Глава 1) последовательно рассмотрены основные требования к материалам биомедицинского назначения, описаны свойства хитозана, коллагена, полилактида и полиэтиленоксида, приведены аргументы к выбору этих объектов для формирования трехмерных конструкций. Дано общее представление о существующих методах формирования материалов биомедицинского назначения, подробно рассмотрены лазерные методы структурирования и лежащие в их основе физические явления, описана структура и свойства фотоинициаторов. Также обсуждены методы пост-обработки биоматериалов: модификация в среде скСО_2 , методы формирования шаблонов для направленного клеточного роста.

В Главе 2 даны основные характеристики используемых в диссертации материалов, описана подготовка ФПК, методы формирования пленочных образцов и трехмерных структур, фотосшивание коллагеновых материалов и нанесение на них армирующих полилактидных шаблонов, приведена методика обработки структур в скСО_2 . Также описаны методы исследования поверхностных и механических свойств сформированных

полимерных материалов (испытания на растяжение, наноиндентометрия; флуоресцентная, 3D-, ИК-микроскопия, СЭМ, АСМ), их внутренней структуры (РФА, флуориметрия; УФ-, ИК-спектметрия). Для расчета свободной энергии поверхности полимерных материалов использован метод Оунса, Вендта, Рабеля и Кьельбле. Для капель экстрагируемого в реактор вещества после scCO_2 обработки проведен масс-спектрометрический анализ. Отмечено, что для образцов исследована биосовместимость в том числе их долгосрочная стабильность *in vivo* и способность регулировать клеточное поведение. Подробности клеточных экспериментов и имплантации вынесены в Приложения Е–З и К.

Основные результаты диссертации изложены в четырех главах.

Глава 3 посвящена биополимерным материалам на основе хитозана: самопроизвольно формирующимся агрегатам, пленочным образцам и трехмерным конструкциям, полученным однофотонной лазерной стереолитографией. Показано, что рост степени замещения хитозана аллильными фрагментами приводит к увеличению размера формирующихся агрегатов и к уменьшению относительного удлинения фотосшитых пленочных образцов, что автор связывает с усилением гидрофобных взаимодействий и образованием поперечных сшивок. Методом лазерной стереолитографии сформированы трехмерные конструкции без применения дополнительных сшивающих агентов для производных хитозана со степенью замещения 47–50%; в остальных случаях в ФПК необходимо было вводить ПЭГ-ДА. Мезенхимальные стволовые клетки человека прикреплялись, распластывались и пролиферировали на поверхности полимерных конструкций, причем интересно, что образцы из немодифицированного хитозана клеточную адгезию не поддерживали. Продемонстрировано также, что введение аллильных групп повышает основные свойства молекулы хитозана, тем самым препятствует некротическим и островоспалительным изменениям тканей при имплантации трехмерных конструкций *in vivo*. В целом, разработанные ФПК и подобные трехмерные конструкции на их основе могут быть перспективны для восстановления тканевых дефектов критического размера (от 1 см).

Установлено также, что, в отличие от отмывки в химических растворителях, при обработке полимерных конструкций в среде scCO_2 происходит десорбция несвязанной воды и несшитых компонентов ФПК. Показано, что в зависимости от режима пост-обработки возможно до 2-х порядков увеличить локальный модуль упругости полимерных конструкций, что выше, чем при лиофильном осушении. После обработки в среде scCO_2 уменьшается средняя шероховатость, растет контактный угол смачивания, снижаются поверхностная энергия и полярность конструкций, отсутствует цитотоксическое действие на фибробласты NIH 3T3. Таким образом, пост-обработка

полимерных биodeградируемых материалов в среде scCO_2 может быть актуальна для культивирования тканеспецифичных клеток, чувствительных к нанотопографии, и помимо этого применяться для биodeградируемых материалов другого состава, когда требуется регулирование механических свойств для их соответствия со свойствами регенерируемых тканей или изменение полярности поверхности и ее гидрофобизация, например, для последующей модификации биodeградируемых материалов протеинами.

В Главах 4 и 5 автором диссертации предложен новый подход к получению упрочненных коллагеновых биоматериалов с помощью комбинирования фотохимического сшивания и лазерно-индуцированного нанесения армирующих шаблонов из фоточувствительного полилактида. Таким образом сформированы губчатые и пленочные гибридные материалы (на основе коллагеновых губок и пленок, соответственно). Продемонстрирован рост модуля упругости до 7 раз, показана направленная пролиферация клеток (мышинных фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека), при том, что для коллагеновых материалов без шаблона селективная адгезия к поверхности не наблюдалась. При лазерном воздействии отсутствовала трансформация коллагеновых волокон. Для скорости сканирования лазерным излучением 3 мм/с продемонстрирована зависимость механических свойств пленочных гибридных коллагеновых материалов от геометрической конфигурации армирующего шаблона: модуль упругости увеличивается в 6 раз для «полосатых» шаблонов в сравнении с «сетчатыми», что автор связывает с влиянием термомеханических напряжений, которые образуются с фотосшитом полимера при длительном воздействии лазера.

Предложенные условия лазерно-индуцированного нанесения армирующего полилактидного шаблона могут быть перспективны для замены химического сшивания коллагеновых материалов, в том числе, децеллюляризованных. Кроме того, возможно регулировать механические и поверхностные свойства структур, тем самым осуществлять контроль за клеточным поведением, создавать определенное пространственное положение клеток. Формирование на коллагеновых материалах флуоресцирующих полилактидных шаблонов (максимум при 520 нм) в дальнейшем позволит исследовать их биodeградацию *in vivo* без необходимости разрабатывать сложные гистологические процедуры и жертвовать экспериментальными животными.

В Главе 6 разработанные ФПК на основе производных хитозана и ФПК из разветвленного полилактида послужили основой для формирования трехмерных структур методом лазерной микростереолитографии, основанной на двухфотонной полимеризации (метод 2ФП). Для сополимеров хитозана с олиго(L,L-/D,L-лактидом) показано, что

стереохимический состав привитых цепей влияет на оптимальные параметры структурирования методом 2ФП и механические свойства трехмерных микроструктур: ФПК, основанная на сополимере с олиго(L,D-лактидом) демонстрировала более широкое окно параметров, микроструктуры характеризовались большим модулем упругости в сравнении с сополимером с олиго(L,L-лактидом)). Показана хорошая совместимость микроструктур на основе производных хитозана с первичной культурой гиппокампа, что делает перспективным их использование для нейротрансплантации.

Также сформированы полилактидные микроструктуры с модулем упругости 4,11 ГПа, которые способствовали остеогенной дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток, поддерживали образование кости *in vivo* при имплантации в дефекты черепа мышей. В дальнейшем этот результат заслуживает внимания с точки зрения замещения костных дефектов и инициирования спонтанной остеогенной дифференцировки.

Достоверность результатов диссертационной работы обеспечивается использованием прецизионного оборудования и современных методов характеризации формируемых материалов. Воспроизводимость предложенных условий структурирования и пост-обработки биodeградируемых материалов и конструкций подтверждается проведенными на больших выборках натурными экспериментами (*in vitro*, *in vivo*).

Автореферат полностью передает содержание диссертации, дает представление об объеме и результатах выполненных исследований, квалификации автора. Результаты диссертации прошли апробацию на международных и российских конференциях (сделано 26 докладов), получено 2 патента РФ. Суть диссертации в достаточной мере отражена в 11 статьях, опубликованных в журналах из списка ВАК, входящих также в системы цитирования Web of Science и Scopus.

По работе возникло несколько замечаний и вопросов.

1. Хотелось бы увидеть в тексте диссертации обоснование выбранного направления модификации хитозана прививкой аллильных групп. Почему именно аллильных при имеющемся разнообразии вариантов введения в состав хитозана более реакционноспособных винильных групп, чем содержащиеся в составе аллильного фрагмента?

2. В работе часто некорректно приводится запись погрешности определения физико-химических величин. Например, как следует понимать запись в табл.3 «604,0±108,1», где недостоверным является уже третий разряд числа?

3. Когда речь идет о ковалентной сшивке полимеров обычно проводится определение содержания золь и гель фракций, как главной характеристики продукта

сшивки, определяющей остальные свойства материала, прежде всего его физико-механику. Проводился ли такой анализ в работе?

Указанные замечания носят исключительно дискуссионный характер и не снижают высокой научной ценности и практической значимости работы.

Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым ВАК России к кандидатским диссертациям, а её автор, Бардакова Ксения Николаевна, заслуживает присвоения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.7 – Высокомолекулярные соединения.

Официальный оппонент:

Профессор кафедры физической химии факультета химии веществ и материалов Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)"

Доктор химических наук (1.4.7 – Высокомолекулярные соединения), доцент

Сивцов Евгений Викторович

«20» сентября 2024 г.

Адрес: 190013, г. Санкт-Петербург, Московский проспект, дом 24-26/49 литера А
Тел.: +7 (812) 494-9367, e-mail: sivtcovev@technolog.edu.ru

Подпись _____
Начальн _____
