

000238

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук
(ИБХФ РАН)
Косыгина ул., д. 4, Москва, 119334,
Тел.: (499) 137-64-20, факс: (499) 137-41-01
E-mail:ibcp@sky.chph.ras.ru

ОКПО 40241274, ОГРН 1037739274308
ИНН/КПП 7736043895/773601001

26.09.2024 № 12113-6215/468
на № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки
Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук
д.х.н., профессор, Курочкин И.Н.
«26» сентября 2024 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

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

Актуальность темы диссертации. Диссертационная работа Бардаковой К.Н. посвящена актуальному направлению современного материаловедения – разработке новых биосовместимых фотополимеризующихся композиций (ФПК) и формированию на их основе биодеградируемых материалов биомедицинского назначения, в том числе трехмерных конструкций сложной геометрии и гибридных материалов, регулирующих клеточное поведение. Подобные полимерные материалы являются востребованными в регенеративной медицине, тканевой инженерии, биофармацевтике.

В качестве основных объектов исследования в диссертации обоснованно выбран природный катионный полиэлектролит хитозан (неиммуногенный, биодеградируемый, обладает противогрибковыми и антимикробными свойствами, демонстрирует минимальный тканевый ответ и фиброзную инкапсуляцию при имплантации) и белок коллаген (гидрофилен, характеризуется минимальной антигенностью, способен к ферментативной биодеградации).

Несмотря на уникальные свойства этих природных полимеров, существует ограниченное число биодеградируемых материалов на их основе: преимущественно они представлены в форме гелей, коллоидных растворов, пленок, губок и используются для закрытия плоскостных раневых дефектов кожи. Поэтому особый практический интерес представляет разработка полимерных композиций, из которых можно сформировать трехмерные конструкции, повторяющие сложную геометрию дефекта ткани или органа пациента.

Среди методов изготовления подобных полимерных конструкций заслуживают внимания технологии быстрого прототипирования, в частности методы однофотонной и

двухфотонной лазерной стереолитографии. Для масштабирования методов лазерной стереолитографии в регенеративной медицине требуется разработка широкой номенклатуры биосовместимых ФПК, что явилось одной из задач этой диссертации.

Ограниченное число биodeградируемых материалов биомедицинского назначения на основе хитозана и коллагена обусловлено также их низкими механическими характеристиками, высокой скоростью деградации. Для улучшения этих свойств в диссертации использовали смеси хитозана с диакрилатом полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДА), а для получения коллагеновых биodeградируемых материалов – фоточувствительный разветвленный полилактид.

Особую прикладную значимость в диссертации представляют исследования по пост-обработке сформированных биоматериалов в сверхкритическом диоксиде углерода (scCO_2). Данный метод можно рассматривать как способ регулирования механических свойств и шероховатости поверхности биodeградируемых материалов, а также использовать для стерилизации и экстракции низкомолекулярных компонентов из полимерных конструкций.

Автор диссертации предлагает новый комбинированный подход для упрочнения коллагеновых образцов (губок и пленок), что актуально для регулирования клеточного прикрепления и роста и можно в дальнейшем применить на децеллюляризованных материалах для замены процедуры химического сшивания.

Таким образом, Бардаковой К.Н. разрабатываются новые материалы биомедицинского назначения с важными для дальнейшего применения в регенеративной медицине свойствами, и диссертация безусловно является актуальным исследованием как в научном, так и в практическом плане.

Научная новизна диссертации определяется актуальностью задач и поставленных целей. Так, впервые из ФПК на основе хитозана получен широкий ряд биodeградируемых материалов различной конфигурации: полимерные носители, пленочные и губчатые конструкции, трехмерные микроструктуры. Продемонстрировано, что с ростом степени замещения хитозана аллильными фрагментами может быть увеличен диапазон оптимальных скоростей сканирования лазерным излучением и формируемая трехмерная конструкция становится более устойчивой в водных средах. Показано, что стереохимический состав привитых цепей хитозана влияет на параметры лазерного структурирования и механические свойства трехмерных структур: ФПК, основанная на сополимере хитозана с олиго(L,D)-лактидом, демонстрирует более широкое окно параметров печати, при этом сформированные структуры характеризуются большим модулем упругости в сравнении с сополимером хитозана с олиго(L)-лактидом.

Установлено, что в отличие от стандартной процедуры отмывки в растворителях, обработка трехмерных структур в среде scCO_2 позволяет экстрагировать несшитые компоненты ФПК. Такая обработка является перспективным методом предстерилизационной подготовки полимерных гидрогелевых структур и также способом регулирования свойств поверхности биodeградируемых материалов (шероховатости, локального модуля упругости, углов смачивания, поверхностной энергии).

Предложен новый подход к получению упрочненных коллагеновых биodeградируемых материалов с помощью комбинирования фотохимического сшивания и лазерно-индуцированного нанесения армирующих шаблонов из фоточувствительного полилактида. Продемонстрирована адгезия коллагеновых биodeградируемых материалов в отношении первичных мышечных фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток

(МСК) костного мозга человека, также направленная пролиферация клеток, при том, что для коллагеновых материалов без шаблона селективная адгезия к поверхности не наблюдалась.

Практическая значимость. В диссертации показано, что путем изменения количества введенных в структуру хитозана гидрофобных фрагментов, а также стереохимического состава привитых цепей возможно формировать полимерные носители требуемых размеров, в широком диапазоне регулировать механические свойства трехмерных конструкций, повышать производительность лазерного структурирования. Также продемонстрировано, что введение аллильных групп повышает основные свойства молекулы хитозана, тем самым препятствует некротическим и островоспалительным изменениям тканей при имплантации трехмерных конструкций *in vivo*. Разработанные фотополимерные композиции и подобные трехмерные конструкции на их основе могут быть перспективны для восстановления тканевых дефектов критического размера (от 1 см).

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.

Предложенные в диссертации 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.

Хорошая совместимость трехмерных микроструктур на основе производных хитозана с первичной культурой гиппокампа и формирование на поверхности микроструктур морфологически полноценной нейронной сети представляет интерес с точки зрения их использования для нейротрансплантации. Полилактидные микроструктуры с модулем упругости 4,11 ГПа заслуживают внимания с точки зрения замещения костных дефектов и инициирования спонтанной остеогенной дифференцировки.

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

По теме диссертации опубликовано 11 статей в журналах из списка ВАК при Минобрнауки РФ, входящих в системы цитирования Web of Science и Scopus; сделано 26 докладов на международных и российских конференциях, получено 2 патента РФ.

Содержание и оформление диссертации. Диссертационная работа Бардаковой К.Н. имеет традиционную структуру: состоит из введения, литературного обзора, методической части, описания и обсуждения результатов (в четырех главах), заключения,

списков цитируемой литературы (338 ссылок), терминов и сокращений, 16 приложений. Работа изложена на 177 страницах, содержит 66 рисунков и 9 таблиц.

Во введении диссертации Бардакова К.Н. логично обосновывает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи работы, практическую значимость и научную новизну; положения, выносимые на защиту; описывает степень достоверности и апробацию результатов, личный вклад и структуру работы.

В Главе 1 приведен подробный обзор литературы: 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 биоматериалов, рассмотрены лазерные методы структурирования и лежащие в их основе физические явления, описаны свойства фотоинициаторов; обсуждены методы пост-обработки биоматериалов (модификация в среде scCO_2 , методы формирования шаблонов).

Глава 2 содержит описание объектов исследования, отдельно для каждой главы результатов подробно описаны методы формирования и методики исследования, которые позволяют всесторонне охарактеризовать полимерные биоматериалы, в том числе их биосовместимость и биodeградацию *in vivo*. Подробности синтеза производных хитозана и фоточувствительного полилактида, выделения коллагена вынесены в Приложения Б–Г. Методики клеточных испытаний, имплантации и гистологического анализа также приводятся в Приложениях Е–З, К.

Глава 3 посвящена биополимерным материалам на основе хитозана, а именно из аллилзамещенных производных хитозана (степень замещения изменялась от 8 до 50%) сформированы и охарактеризованы полимерные носители, пленочные и губчатые конструкции, трехмерные гидрогелевые структуры. Показано, что изменяя количество гидрофобных фрагментов возможно получать полимерные носители существенно большего размера по сравнению с исходным хитозаном (гидродинамический диаметр агрегатов от 1 до 3,5 мкм). Для фотосшитых пленок из производных хитозана с высокими степенями замещения наблюдали наиболее выраженное снижение относительного удлинения. Также именно для производных хитозана со степенью замещения 47–50% показана возможность формирования трехмерных структур методом лазерной стереолитографии без применения дополнительных сшивающих агентов. Сформированные трехмерные конструкции обработаны в среде scCO_2 в статическом и проточном режимах, в результате чего обнаружено увеличение локального модуля упругости (до 2-х порядков), снижение средней шероховатости и поверхностной энергии конструкций, также отсутствует цитотоксическое действие на фибробласты NIH 3T3. Полученные результаты интересны тем, что после обработки в среде scCO_2 сохраняется гелевая структура биоматериала (т.е. благоприятные условия для роста клеток), также изменение модуля упругости происходит без применения каких-либо армирующих конструкций, которые при имплантации могут значительно замедлять скорость деградации *in vivo*.

В Главах 4 и 5 представлено обсуждение результатов по формированию и исследованию свойств гибридных коллагеновых материалов (губчатых и пленочных). Результаты этих глав хорошо согласованы друг с другом и резюмируются клеточными тестами, в которых автор диссертации демонстрирует способность разработанных биоматериалов поддерживать направленный клеточный рост. Достаточно подробно

охарактеризована топография и свойства поверхности гибридных материалов, их механические свойства. Отмечается интенсивная флуоресценция полилактидного шаблона, что может позволить исследовать биодеградацию гибридных материалов *in vivo* без большого количества экспериментальных животных.

В Главе 5 также приведены данные о влиянии геометрии армирующего шаблона (исследовали «полосатые» и «сетчатые» шаблоны) на механические свойства пленочного гибридного материала. Для скорости лазерного излучения 15 мм/с механические свойства биоматериала не зависят от геометрической конфигурации шаблона. Для скорости лазерного излучения 3 мм/с, напротив, установлено, что модуль упругости увеличивается в 6 раз для «полосатых» шаблонов в сравнении с «сетчатыми», что автор диссертации связывает с влиянием термомеханических напряжений, которые образуются с фотосшитом полимере при длительном воздействии лазера.

В Главе 6 автор диссертации демонстрирует применение разработанных в предыдущих главах ФПК на основе хитозана (использованы аллилзамещенные производные хитозана и сополимеры хитозана с олиго(L-/D,L-лактидом)) и ФПК из полилактида для формирования трехмерных микроструктур методом лазерной микростереолитографии, основанной на двухфотонной полимеризации. Из экспериментальных данных обнаружилось, что ФПК, основанная на сополимере с олиго(L,D-лактидом) имеет более широкое окно параметров печати, микроструктуры обладают большим модулем упругости в сравнении с сополимером хитозана с олиго(L-лактидом)). Микроструктуры из фоточувствительного полилактида с модулем упругости 4,11 ГПа инициировали спонтанную остеогенную дифференцировку и поддерживали образование кости *in vivo* при имплантации в дефекты черепа мышей.

Диссертацию завершает заключение, где автор кратко перечисляет перспективы развития темы работы.

В целом, диссертационная работа хорошо структурирована и проиллюстрирована, представляет собой законченное научное исследование и производит благоприятное впечатление.

По содержанию и оформлению диссертации можно сделать следующие замечания и рекомендации:

1. Полезно было бы провести систематическое исследование изменения размеров агрегатов в зависимости от концентрации производных хитозана, а не только от степени замещения функциональных групп аллильными фрагментами.
2. В качестве компьютерных моделей хитозановых конструкций автор использует пластины с отверстиями и цилиндрические структуры с прорезями различной конфигурации. Может ли автор прокомментировать выбор подобной геометрии конструкций?
3. В работе нет никакой информации о коэффициентах набухания и биодеградации для полученных коллагеновых материалов. Исследование этих вопросов выглядит необходимым, учитывая предполагаемое использование.
4. Основные результаты и выводы автор приводит только в автореферате. Желательно также в заключении диссертации дать не только перспективы развития темы диссертации, но и выводы по работе.
5. Текст диссертации хорошо оформлен, однако, много информации вынесено в Приложения к диссертации. Было бы удобнее для восприятия результатов и их обсуждения более подробно дать в основном содержании диссертации полученные

результаты по биосовместимости и имплантации полимерных конструкций, тем более диссертация имеет яркую практическую направленность.

Указанные замечания не носят принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку работы.

Заключение. Диссертацию Бардаковой К.Н. можно считать законченной научно-исследовательской работой, в которой решается задача по разработке новых полимерных материалов и трехмерных конструкций биомедицинского назначения с важными свойствами для дальнейшего применения в регенеративной медицине и тканевой инженерии.

Диссертационная работа «Влияние структуры и физико-механических свойств трехмерных биodeградируемых полимерных материалов на их биосовместимость и клеточную адгезию» соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым ВАК России к кандидатским диссертациям. Автор диссертации, Бардакова Ксения Николаевна, заслуживает присвоения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.7 – Высокомолекулярные соединения.

Доклад Бардаковой К.Н. по материалам диссертации заслушан, отзыв обсужден и одобрен на семинаре Лаборатории физико-химии композиций синтетических и природных полимеров ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН (протокол № 20 от 24 сентября 2024 года).

Председатель семинара:

Старший научный сотрудник Лаборатории физико-химии композиций синтетических и природных полимеров ИБХФ, кандидат химических наук

Т.В. Монахова

Монахова Т.В

24.09.2024

Отзыв подготовлен главным научным сотрудником, зав. лабораторией функциональных свойств биополимеров, доктором химических наук Семеновой Марией Германовной.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН)

119334, г. Москва, ул. Косыгина, д.4

Тел.: +7(495)939 71 02

e-mail: mariagersem@mail.ru

д.х.н.

М.Г. Семенова

Семенова М.Г.

24.09.2024

Подписи к.х.н. Монаховой Т.В. и д.х.н. Семеновой М.Г. заверяю:

Ученый секретарь ИБХФ РАН,

к.б.н.

С.И. Скалацкая

Скалацкая С.И.

