

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу
Силиной Надежды Евгеньевны на тему: «Синтез блок-
сополимеров хитозана и D,L-лактида под действием
ультразвука. Композиты на основе хитозана и D,L-лактида.
Структура и свойства»,**

представленную на соискание ученой степени кандидата
химических наук по специальности
02.00.06 – высокомолекулярные соединения

Диссертационная работа Силиной Н.Е. посвящена созданию и изучению свойств новых композиционных материалов на основе биосовместимых полимеров хитозана и поли(D,L-лактида) (ПЛА), предназначенных для использования в медико-биологических целях.

Актуальность темы диссертации. Разработке новых биodeградируемых материалов медико-биологического назначения на основе полисахаридов и биосовместимых синтетических полимеров в настоящее время посвящено значительное число исследований как у нас в стране, так и за рубежом. Для создания таких материалов весьма перспективным является использование полисахарида природного происхождения хитозана, обладающего хорошей пленкообразующей способностью, а также уникальными физико-химическими свойствами и доказанной биологической мультифункциональностью. Однако хитозан обладает недостаточной прочностью, хрупкостью и неконтролируемой скоростью биodeградации. Эти недостатки преодолеваются путем совмещения хитозана с ПЛА, который относится к наиболее перспективным синтетическим биосовместимым полимерам, используемым в биомедицинской практике. Наиболее удобным способом для совмещения этих полимеров является получение привитых, блок-сополимеров ПЛА и хитозана, а также создание смесевых композиций на основе гомополимеров. Для осуществления сополимеризации значительный интерес представляет использование физических методов инициирования и активации, таких как ультразвуковое (УЗ) воздействие. Использование ультразвука для инициирования сополимеризации обеспечивает химическую чистоту и однородность получаемых сополимеров. В связи с этим диссертационная работа Силиной Н.Е., посвященная разработке новых гибридных полимерных материалов медико-биологического назначения на основе хитозана и ПЛА, в том числе с использованием ультразвука, является *актуальной*.

Научная новизна работы обусловлена тем, что в ней содержатся новые сведения и описаны новые приемы в области получения композитов и сополимеров на основе хитозана и полилактида, в частности:

- впервые синтезированы блок-сополимеры хитозана с D,L-лактидом методом УЗ воздействия на растворы смесей гомополимеров, доказано полиблочное строение блок-сополимеров;

- показано, что использование низкомолекулярных соединений в бинарном растворителе, способных блокировать функциональные группы ПЛА, позволяют существенно расширить диапазон его концентраций в смесях с хитозаном;

- исследовано влияние введения блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом в качестве эффективных компатибилизаторов, обеспечивающих формирование однородных смесей хитозана с ПЛА;

- осуществлен синтез сополимеров D,L-лактида с титаноксидом с использованием изопропоксида титана как в качестве инициатора полимеризации, так и со(мономера) для дальнейшего получения композиций с хитозаном.

Практическая значимость

Разработаны методы получения новых перспективных биodeградируемых материалов с хорошими физико-механическими характеристиками на основе хитозана и ПЛА, в том числе с регулируемым временем разложения (Патент RU 2540468). Полученные материалы представляют интерес для использования в биомедицинских целях в качестве раневых покрытий и скаффолдов.

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 (ФГБОУ ВО РГУ им. А.Н.Косыгина, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный технический университет», ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный технический университет», ФГУ «Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздравсоцразвития России).

Диссертационная работа по своим целям, задачам, содержанию, научной новизне и методам исследования соответствует пунктам 4, 6, 7 и 9 паспорта специальности 02.00.06 – высокомолекулярные соединения.

По своему объему и структуре диссертация соответствует общепринятым требованиям, она включает в себя введение, обзор литературы, экспериментальную часть, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список цитируемой литературы из 268 наименований. Работа изложена на 136 страницах машинописного текста, включает 37 рисунков и 18 таблиц.

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 хитозана и полилактида, а также композиций на их основе, обсуждены

приемы химической модификации этих полимеров и способы их совмещения. Литературный обзор включает очень большое для кандидатской диссертации количество источников (268), из которых более 50% относятся к периоду последних 10 лет.

В главе 2 (*Экспериментальная часть*) дана характеристика объектов исследования, вспомогательных материалов, подробно описаны методы получения и исследования свойств сополимеров на основе хитозана и ПЛА. В описании экспериментов впечатляет совокупность привлеченных физико-химических методов исследования, использованных для всесторонней характеристики состояния исходных полимеров и полученных полимерных продуктов, а также специальных методов, включая методы исследования биологической активности полученных полимерных продуктов *in vivo*.

Раздел 3.1. несмотря на название, посвящен, по сути, выяснению вопроса о совместимости полимеров хитозана и ПЛА с целью подбора условий для осуществления их сополимеризации, инициируемой ультразвуком. В ряде литературных источников отмечается, что эти полимеры являются несовместимыми. Для оценки совместимости автор в качестве критерия использует значения параметра растворимости Гильдебранда (δ). Как правило, считается, что компоненты совместимы, если $\delta_1 - \delta_2 < 1.5$, где δ_1 и δ_2 – параметры растворимости полимеров 1 и 2, соответственно. Из данных теоретического расчета (δ (хитозан) = 9.1 [(кал/см³)^{1/2}], δ (ПЛА) = 8.5 [(кал/см³)^{1/2}], т.е. δ (хитозан) – δ (ПЛА) = 0.6 \ll 1.5), сделан вывод о совместимости. На мой взгляд, здесь не следовало бы заявлять о совместимости так однозначно. Кроме того, в теории полимерных смесей общепринятыми являются понятия «термодинамической совместимости» и «кинетической совместимости». Здесь следовало бы конкретизировать.

Далее была проведена оптимизация состава смешанного растворителя для получения гомогенного раствора смеси этих полимеров. Использование оптимального соотношения растворителей позволило получить гомогенную смесь с соотношением хитозан: ПЛА = (90: 10). Осадок, образующийся при дальнейшем увеличении массовой доли ПЛА, по мнению автора, представляет собой интерполимерный комплекс, что подтверждено данными ИК-спектров.

Целесообразным и эффективным представляется использованный в работе прием блокирования карбонильных групп ПЛА аминокислотными соединениями (модификаторами). Этот прием позволил увеличить содержание ПЛА в смесях с хитозаном до 50 %. Была определена минимальная концентрация модификаторов.

С целью подбора условий для осуществления звуко-химической сополимеризации была получена кривая снижения молекулярной массы (ММ) хитозана в зависимости от времени озвучивания. Также с помощью ИК-спектров было доказано отсутствие химических превращений в структуре хитозана. Полученные результаты представляют самостоятельный научный интерес.

Раздел 3.1. Наиболее сложной задачей работы является выделение и установление строения полученных сополимеров хитозана и ПЛА. В целом автору удалось справиться с этой задачей, используя комбинацию различных приемов и методов. Безусловно, это является заслугой автора, учитывая большую трудоемкость эксперимента. Однако некоторые моменты выглядят не вполне убедительными.

Использование метода экстракции для определения содержания гомополимеров в выделенном сополимере можно считать логичным, но не гарантирующим высокую точность результата. Поскольку использовали поочередно один из растворителей, в котором продукт не растворяется и, по-видимому, не набухает, экстракция гомополимеров могла быть неполной, о чем говорит и слишком высокий выход сополимера (до 95%).

Вполне успешно реализована идея выделения полилактидной составляющей сополимера путем ферментативного разрушения хитозана. Таким образом, были установлены ММ и полидисперсность полилактидных блоков.

Для определения этих характеристик для хитозановых блоков, а также ММ сополимера пришлось использовать встречный эксперимент и предполагаемую аналогию звуко-химических процессов сополимеризации хитозана с ПЛА и хитозана с полиакриламидом (ПАА). ПАА дает водорастворимый сополимер с хитозаном, что позволило определить его характеристики. *Безусловно, полной аналогии быть не может*, но такой выход из положения (замена нерастворимого сополимера водорастворимым) можно считать приемлемым для оценки характеристик на качественном уровне.

Раздел 3.3 посвящен определению физико-механических свойств блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом. В данном разделе получены впечатляющие результаты по увеличению предела прочности при растяжении и относительного удлинения хитозана за счет сополимеризации с полилактидом в присутствии низкомолекулярных амино-содержащих модификаторов. Установлено, что для блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом при содержании последнего 16 мас. % и максимальной длине блоков ($MM = 22.5 \times 10^3$) достигаются оптимальные физико-механические показатели – величина разрушающего напряжения составляет 47 МПа при предельной деформации 20 %. Сделан вполне обоснованный вывод, что длина блоков ПЛА существенно влияет на физико-механические свойства блок-сополимеров – чем длиннее последовательности звеньев ПЛА в цепях блок-сополимеров, тем ярче проявляются их пластические свойства.

Раздел 3.3 посвящен определению физико-механических свойств полимерных продуктов на основе хитозана и полилактида. Было установлено, что смеси хитозана с ПЛА, полученные из совместных растворов в присутствии низкомолекулярных амино-содержащих модификаторов, при оптимальном составе дают пленки с существенно более высокими характеристиками по сравнению с чистым хитозаном.

Далее был произведен эксперимент по введению предварительно синтезированного блочного сополимера хитозана с D,L-лактидом в хитозан и в смесь хитозана с ПЛА в качестве компатибилизатора. Второй способ представляет особый интерес, т.к. позволяет получать качественные композиционные пленки с высоким содержанием ПЛА. При увеличении содержания ПЛА в этих композициях от 10 до 50 мас. % величина разрушающего напряжения композиции возрастает в 1.4 - 1.7 раз и величина предельной деформации при разрыве достигает 13% по сравнению с исходным полисахаридом. Таким образом, автору удалось получить перспективный материал на основе хитозана и ПЛА, представляющий значительный интерес для использования в биомедицинских целях.

Большой **раздел 3.5** посвящен более широкому исследованию структурно-зависимых свойств полученных полимерных продуктов с использованием целого ряда физико-химических методов исследования. Весьма убедительными выглядят данные рентгеноструктурного анализа. Представленные рентгеновские дифрактограммы образцов блок-сополимеров и смесей хитозана с ПЛА (с компатибилизатором), как справедливо отмечается в работе, свидетельствуют о значительных структурных изменениях в хитозане, обусловленных введением ПЛА, а также о выраженном интерполимерном взаимодействии.

Данные АСМ свидетельствуют о том, что топография поверхности блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом с высоким содержанием ПЛА демонстрирует гетерогенность материала, что согласуется с данными рентгеноструктурного анализа (рис. 21).

В **подразделе 3.5.2** представлены данные исследования теплофизических свойств сополимеров хитозана с D,L-лактидом, полученные методами дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и термогравиметрии. Данные о термостойкости получаемых полимерных композитов представляют значительный интерес в практическом и теоретическом отношении. По данным ДСК-кривых сделан вполне обоснованный вывод о том, что введение ПЛА в матрицу хитозана вызывает расширение диапазона температур расстекловывания, что, по мнению автора, может быть связано с пластифицирующим действием ПЛА в отношении хитозана.

С помощью метода термогравиметрии показано, что полученные блок-сополимеры и смесевые пленки обладают более высокой термостойкостью (230-235 °С) по сравнению с исходным хитозаном (207 °С).

В **подразделе 3.5.3** приведены данные микробиологических исследований. Исследования биологической активности и биологической устойчивости полученных полимерных продуктов на основе хитозана и ПЛА придают особую ценность работе т.к. предполагается, что эти материалы разрабатываются для биомедицинского применения. Было показано, что полученные в данной работе образцы материалов на основе хитозана и ПЛА проявляли только бактериостатический эффект, поскольку радиус зоны

ингибирования роста бактерий составлял 3-4 мм, что сохраняется и для блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом с содержанием ПЛА 46-50мас. %.

Интересны данные по исследованию биodeградации *in vivo* образцов блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом, ω (ПЛА) = 26 мас. % на экспериментальных животных в течение 2 месяцев. Оказалось, что пластины полностью биodeградировали под кожей без признаков воспаления. Была исследована биodeградация *in vivo*. Также была изучена грибостойкость образцов пленок блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом с использованием гостированных штаммов микромицетов. Совокупность полученных результатов позволила автору сделать вывод о пригодности полученных сополимеров и композиций для получения биodeградируемых материалов с регулируемым временем разложения.

В подразделе 3.5.4. представлены данные исследования свойств композитов на основе хитозана, блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, модифицированных гидроксипатитом (ГА). Стояла задача оценить влияние ГА, использованного в качестве дополнительного материала для увеличения остеоиндуктивных свойств, на прочностные характеристики получаемых композитов. Помимо решения практической задачи результаты данного исследования интересны в научном плане, т.к. известно, что наноразмерные частицы, введенные в полимерный материал, могут обладать структурно-модифицирующим действием. Данные таблицы 13 подтверждают армирующее действие малых добавок частиц ГА. *Однако в качестве замечания следует заметить, что автор не сопровождает полученный результат какими-либо комментариями по поводу механизма усиливающего действия наноразмерных частиц ГА, введенных в полимерный материал.* Сделан вывод, что композиты, содержащие ГА, могут быть использованы в биомедицинских целях, т.к. даже при высоком содержании ГА он не оказывает существенного влияния на свойства композитов в относительно широком температурном диапазоне.

В разделе 3.6 представлен материал по разработке композиционных материалов на основе хитозана и поли(D,L-лактид-титаноксида). Данный раздел представляется наиболее интересным в практическом и научном аспектах. Был получен сополимер D,L-лактида с титаноксидом, что подтверждено характерными изменениями в ИК-спектрах (рис. 36).

Известно, что диоксид титана является биосовместимым и обладает уникальной способностью генерировать на своей поверхности активные формы кислорода ($O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$) при световом воздействии за счет одноэлектронного перехода $Ti^{4+} + e^- \rightleftharpoons Ti^{3+}$. Эти активные формы кислорода могут связываться с бактериями и микробами, вызывая их гибель.

Совмещение полезных свойств хитозана, поли(D,L-лактида) и диоксида титана может быть достигнуто синтезом сополимеров D,L-лактида с титаноксидом с использованием изопророксида титана *как в качестве инициатора полимеризации, так и со(мономера)* для дальнейшего получения композиций с хитозаном (принципиальное отличие от известных работ). Использование соединений титана в качестве катализатора в реакции

получения полилактида известно из литературных источников (Youngjo Kim, John G. 2002). В работе диссертанта был использован положительный опыт этих авторов, но в отличие от этих работ диссертант поставил и успешно решил задачу использования изопророксида титана без какой-либо модификации не только в качестве катализатора, но и одновременно в качестве сомомера в синтезе с D,L-лактидом. Сомомеры были взяты в различных соизмеримых концентрациях: мольное соотношение D,L-лактид: изопророксид титана варьировалось от 3: 1 до 1: 1, что обеспечивает получение продукта с требуемой (контролируемой) молекулярной массой.

Приведен подробный анализ ИК-спектров, в частности, обсуждены полосы, которые могут указывать на образование последовательностей поли(титаноксида) в цепи сополимера. Ценность данного раздела работы заключается в успешном осуществлении синтеза в оптимальных условиях при варьировании соотношения компонентов реакционной смеси. В результате были получены, как уверяет автор, прозрачные пленки, что подтверждает данными светопропускания. Но, на мой взгляд, здесь уместны были бы фотографии этих пленок, иллюстрирующие их качество и прозрачность.

Впечатляющие данные получены при исследовании физико-механических характеристик композиций поли(D,L-лактид–титаноксида) с хитозаном (таблица 15). Показано, что при соотношении хитозан: поли(D,L-лактид–титаноксида) = 66.7: 33.3 предел прочности при растяжении может достигать 117 МПа при одновременном увеличении относительного удлинения по сравнению с чистым хитозаном.

Композиция хитозан-поли(D,L-лактид–титаноксид) оптимального состава была исследована на биоразлагаемость, биосовместимость и гиппоаллергенность в опытах *in vivo*. Путем проведения больших серий опытов с использованием анализа крови лабораторных животных, после имплантации им испытуемых полимерных образцов, было подтверждено отсутствие у них токсичности и аллергенности. Также методом агаровых пластин было подтверждено эффективное бактерицидное действие пленочных образцов, содержащих полититаноксид, при УФ-воздействии на них. Таким образом, выявленный комплекс полезных свойств полученного композита определяет перспективность его использования в качестве основы тканезамещающих матриц различного назначения.

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.

Результаты диссертационной работы Силовой Н.Е. докладывались на российских и зарубежных конференциях и изложены в 17 научных работах, в том числе в 4 статьях в научных журналах, индексируемых международными реферативно-библиографическими базами научного цитирования *Web of science* и *Scopus*, имеется 1 патент Российской Федерации на изобретение и 12 тезисов докладов.

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 грамотно и аккуратно оформлена.

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

Замечания:

1) В теории смесей полимеров общепринятыми понятиями являются «термодинамическая совместимость» и «кинетическая совместимость». При расчетном обосновании совместимости полимеров через параметры растворимости автор не указывает, о какой совместимости идет речь;

2) Для инициирования сополимеризации в работе использован ультразвук, однако ничего не говорится о механизме звуко-химических реакций. Как минимум, следовало бы в качестве иллюстрации привести схему ультразвукового гомолиза воды с образованием первичных радикалов и производных активных форм;

3) Известно, что при УЗ-воздействии значительная часть энергии превращается в тепловую, однако в работе не сообщается, каким образом поддерживалась указанная температура (21°C) в течение 30 мин;

4) Схема инициируемой ультразвуком сополимеризации на рис. 19 отражает взаимодействие лишь макрорадикалов хитозана и поли(D,L-лактида), разве рекомбинация одноименных макрорадикалов исключается?

5) Данные, представленные в таблице 13, демонстрируют 1,5 кратное увеличение прочности полимерного композита при введении малых добавок ГА. Однако результат никак не прокомментирован с точки зрения структурно-модифицирующего (армирующего) действия наноразмерных частиц, введенных в полимерный материал;

6) В рентгенограммах, представленных на рис. 32, дано объяснение только исчезновению рефлексов хитозана, но не объясняется появление новых рефлексов вблизи $2\theta = 30-35$ градусов;

7) В работе не хватает фотографий полученных композиционных пленочных материалов, иллюстрирующих их качество (например, прозрачность).

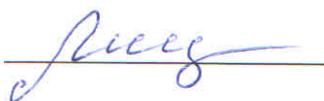
Изложенные замечания не снижают научную значимость полученных диссертантом результатов, не касаются ее существа и не портят общего положительного впечатления от работы. Достоверность и новизна научных выводов не вызывает сомнений. Полнота исследований подтверждается наличием 17 публикаций.

На основании изложенного, диссертационная работа Силиной Н.Е. «Синтез блок-сополимеров хитозана и D,L-лактида под действием ультразвука. Композиты на основе хитозана и D,L-лактида. Структура и свойства» 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, Силина Надежда Евгеньевна, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.06 – высокомолекулярные соединения.

Официальный оппонент,

главный научный сотрудник лаборатории химии и технологии модифицированных волокнистых материалов, доктор химических наук (специальность 05.19.02 – Технология и первичная обработка текстильных материалов и сырья), профессор

13.04.2020

 Липатова Ирина Михайловна

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

