

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного учреждения
«Федеральный научно-исследовательский центр
«Кристаллография и фотоника»
Российской академии наук»

д.ф.-м.н.


О.А. Алексеева

«25» декабрь 2023 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного учреждения
«Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и
фотоника» Российской академии наук» (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника»
РАН)

Диссертация «Влияние структуры и физико-механических свойств трехмерных биodeградируемых полимерных материалов на их биосовместимость и клеточную адгезию» выполнена в лаборатории лазерной химии Института фотонных технологий РАН – структурного подразделения ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН (далее – ИФТ РАН).

В период подготовки диссертации соискатель Бардакова Ксения Николаевна работала в ИФТ РАН в должности младшего научного сотрудника (с 2016 по 2022 гг.) и научного сотрудника (с 2022 г. по настоящее время).

В 2016 году окончила Институт материалов современной энергетики и нанотехнологий (ИМСЭН-ИФХ) Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева» по специальности «Химическая технология материалов современной энергетики», присвоена квалификация «инженер».

Бардакова К.Н. в аспирантуре не обучалась. В 2022 году была прикреплена к Федеральному государственному бюджетному образовательному учреждению высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева» для сдачи кандидатских экзаменов без освоения программ научно-педагогических кадров в аспирантуре (адъюнктуре).

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2023 г. Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего

образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева».

Научный руководитель – Тимашев Петр Сергеевич, доктор химических наук, доцент, Научно-технологический парк биомедицины Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова Минздрава России, научный руководитель.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность работы

Проблема повышения биосовместимости разрабатываемых биodeградируемых полимерных материалов и обеспечение направленного роста клеток, культивируемых на их поверхности, являются одними из центральных задач тканевой инженерии. При этом выбор базовых биodeградируемых материалов в настоящее время довольно ограничен: это природные полимеры, прежде всего, хитозан (полисахарид) и коллаген (белок), а также синтетический полилактид.

Несмотря на обширные возобновляемые источники получения и уникальные свойства хитозана и коллагена, существует ограниченное число биodeградируемых материалов (БМ) на их основе, которые преимущественно представлены в форме гелей, порошков, коллоидных растворов, пленок, губок и используются для закрытия плоскостных раневых дефектов кожи. Для расширения количества доступных БМ на основе хитозана и коллагена актуальна разработка полимерных композиций, из которых могут быть сформированы трехмерные структуры для восстановления поврежденных тканей и органов.

В качестве методов изготовления подобных структур особого внимания заслуживают однофотонная и двухфотонная лазерная стереолитография, с помощью которых получают трехмерные структуры с необходимыми пористостью и шероховатостью. Для масштабирования методов лазерной стереолитографии в регенеративной медицине, как правило, требуется разработка широкой номенклатуры биосовместимых фотополимеризующихся композиций (ФПК), что и явилось одной из задач данной работы.

Необходимо отметить, что природные полимеры зачастую демонстрируют низкие механические характеристики, обладают высокой скоростью деградации, тогда как использование их в смеси с синтетическими полимерами позволяет значительно улучшить свойства БМ, добиться того, чтобы физико-механические свойства трехмерных структур были сопоставимы со свойствами замещающей ткани.

Среди синтетических биodeградируемых полимеров привлекательными для тканевой инженерии являются полиэфиры, в частности, полилактид (ПЛА), а также полимеры на основе полиэтиленгликоля. В связи с этим, в настоящей работе для преодоления указанных недостатков использовали смеси хитозана с

диакрилатом полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДА), а для получения коллагеновых БМ – фоточувствительный разветвленный ПЛА.

Важным этапом для улучшения биосовместимости и контроля клеточного поведения, а именно регулирования степени адгезии и направления клеточного роста, является пост-обработка БМ различными методами.

С учетом изложенного, была определена **цель работы**, состоящая в разработке новых фотополимеризующихся композиций на основе природных и синтетических биodeградируемых полимеров, их структурировании методами лазерной стереолитографии и комплексном исследовании свойств сформированных материалов биомедицинского назначения, в том числе, после этапа их пост-обработки в среде scCO_2 и лазерно-индуцированного нанесения полимерных шаблонов различной геометрии.

Научная новизна

Впервые из ФПК на основе хитозана получен широкий ряд БМ различной конфигурации: полимерные носители, пленочные и губчатые конструкции, трехмерные микроструктуры. Продemonстрировано, 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,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 БМ (шероховатости, локального модуля упругости, углов смачивания, поверхностной энергии).

Предложен новый подход к получению упрочненных коллагеновых БМ с помощью комбинирования фотохимического сшивания и лазерно-индуцированного нанесения армирующих шаблонов из фоточувствительного ПЛА. Продemonстрирован рост модуля упругости до 7 раз, показана адгезия коллагеновых БМ в отношении первичных мышечных фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга человека, также направленная пролиферация клеток, при том, что для коллагеновых БМ без шаблона селективная адгезия к поверхности не наблюдалась.

Практическая значимость

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.

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 БМ в среде scCO_2 может быть актуальна для культивирования тканеспецифичных клеток, чувствительных к нанотопографии, и помимо этого применяться для БМ 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 БМ протеинами.

Разработанный метод лазерно-индуцированного нанесения армирующего полилактидного шаблона может быть перспективен для замены химического сшивания коллагеновых материалов, в том числе, децеллюляризованных. Кроме того, этот метод позволяет 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 в дальнейшем позволит исследовать их биodeградацию *in vivo* без необходимости разрабатывать сложные гистологические процедуры и жертвовать экспериментальными животными.

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.

Личный вклад автора

Автор принимала участие в постановке задач, подготовке и проведении экспериментальных исследований, в обработке, интерпретации и обобщении полученных результатов, в написании и подготовке работ к печати. Работа

выполнена в рамках проведения исследований, включенных в план ИФТ РАН, грантов РФФИ, и дважды была поддержана стипендией президента РФ.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов диссертационной работы обеспечивается использованием прецизионного оборудования и современных методов характеристики формируемых материалов. Воспроизводимость разработанных методик структурирования и пост-обработки биodeградируемых материалов и конструкций подтверждается проведенными на больших выборках натурными экспериментами (*in vitro*, *in vivo*). Полученные экспериментальные данные верифицированы в рамках отчетов по НИР от государственных ведомств (РФФИ, Минобрнауки России) и согласуются с частично имеющимися в литературе данными других авторов.

По теме диссертации опубликовано 11 статей в зарубежных и российских журналах, индексируемых в Scopus и/или Web of Science, сделано 26 докладов на международных и российских конференциях, получено 2 патента РФ.

Статьи:

1. **Bardakova K.N.** Tailoring the collagen film structural properties via direct laser crosslinking of star-shaped polylactide for robust scaffold formation / Bardakova K.N., Grebenik E.A., Minaev N. V., Churbanov S.N., Moldagazyeva Z., Krupinov G.E., Kostjuk S. V, Timashev P.S. // Materials Science and Engineering: C – 2020. – Т. 107 – С.110300.
2. **Bardakova K.N.** From aggregates to porous three-dimensional scaffolds through a mechanochemical approach to design photosensitive chitosan derivatives / Bardakova K.N., Akopova T.A., Kurkov A. V., Goncharuk G.P., Butnaru D. V., Burdukovskii V.F., Antoshin A.A., Farion I.A., Zharikova T.M., Shekhter A.B., Yusupov V.I., Timashev P.S., Rochev Y.A. // Marine Drugs – 2019. – Т. 17 – № 48 – С.1–18.
3. Akopova T.A. Solvent-free synthesis and characterization of allyl chitosan derivatives / Akopova T.A., Demina T.S., Cherkaev G. V., Khavpachev M.A., **Bardakova K.N.**, Grachev A. V., Vladimirov L. V., Zelenetskii A.N., Timashev P.S. // RSC Advances – 2019. – Т. 9 – № 36 – С.20968–20975.
4. **Bardakova K.N.** Reinforced Hybrid Collagen Sponges for Tissue Engineering / Bardakova K.N., Grebenik E.A., Istranova E.V., Istranov L.P., Gerasimov Y.V., Grosheva A.G., Zharikova T.M., Minaev N.V., Shavkuta B.S., Dudova D.S., Kostyuk S.V., Vorob'eva N.N., Bagratashvili V.N., Timashev P.S., Chailakhyan R.K. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine – 2018. – Т. 165 – № 1 – С.142–147.
5. Lazhko A.E. Supercritical Fluid Treatment of Three-Dimensional Hydrogel Matrices Obtained from Allylchitosan by Laser Stereolithography / Lazhko A.E.,

Bardakova K.N., Shavkuta B.S., Churbanov S.N., Markov M.A., Akopova T.A., Parenago O.O., Grigoryev A.M., Timashev P.S., Lunin V. V., Bagratashvili V.N. // Russian Journal of Physical Chemistry B – 2018. – Т. 12 – № 7 – С.1144–1151.

6. Demina T.S. Two-photon-induced microstereolithography of chitosan-g-oligolactides as a function of their stereochemical composition / Demina T.S., **Bardakova K.N.**, Minaev N.V., Svidchenko E.A., Istomin A.V., Goncharuk G.P., Vladimirov L.V., Grachev A.V., Zelenetskii A.N., Timashev P.S., Akopova T.A. // Polymers – 2017. – Т. 9 – № 7 – С.302.

7. Timashev P.S. Supercritical fluid treatment of three-dimensional hydrogel matrices, composed of chitosan derivatives / Timashev P.S., **Bardakova K.N.**, Churbanov S.N., Krotova L.I., Grigoriev A.M., Novikov M.M., Lakeev S.G., Sevastianov V.I., Bagratashvili V.N. // Vestnik Transplantologii i Iskusstvennykh Organov – 2016. – Т. 18 – № 3 – С.85–93.

8. Timashev P. Novel biodegradable star-shaped polylactide scaffolds for bone regeneration fabricated by two-photon polymerization / Timashev P., Kuznetsova D., Koroleva A., Prodanets N., Deiwick A., Piskun Y., **Bardakova K.**, Dzhoyashvili N., Kostjuk S., Zagaynova E., Rochev Y., Chichkov B., Bagratashvili V. // Nanomedicine – 2016. – Т. 11 – № 9 – С.1041–1053.

9. Timashev P.S. Fabrication of microstructured materials based on chitosan and its derivatives using two-photon polymerization / Timashev P.S., Demina T.S., Minaev N. V, **Bardakova K.N.**, Koroleva A. V, Kufelt O.A., Chichkov B.N., Panchenko V.Y., Akopova T.A., Bagratashvili V.N. // High energy chemistry – 2015. – Т. 49 – № 4 – С.300–303.

10. Timashev P.S. Novel biocompatible material based on solid-state modified chitosan for laser stereolithography / Timashev P.S., **Bardakova K.N.**, Demina T.S., Pudovkina G.I., Novikov M.M., Markov M.A., Asyutin D.S., Pimenova L.F., Svidchenko E.A., Ermakov A.M. // Современные технологии в медицине – 2015. – Т. 7 – № 3 (eng) – С.20–29.

11. Akopova T.A. Solid-state synthesis of unsaturated chitosan derivatives to design 3D structures through two-photon-induced polymerization / Akopova T.A., Timashev P.S., Demina T.S., **Bardakova K.N.**, Minaev N. V, Burdukovskii V.F., Cherkaev G. V, Vladimirov L. V, Istomin A. V, Svidchenko E.A. // Mendeleev Communications – 2015. – Т. 4 – № 25 – С.280–282.

Патенты:

1. Пат. 2648514 Российская Федерация, МПК А61К 9/00 (2006.01). Способ

получения структурированных гидрогелей / Тимашев П.С., **Бардакова К.Н.**, Акованцева А.А., Юсупов В.И., Баграташвили В.Н.; заявитель и патентообладатель ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. – № 2016110444, заявл. 22.03.2016; опубл. 27.09.2017, Бюл. № 27. – 7 с.

2. Пат. 2660588 Российская Федерация, МПК А61L 15/10 (2006.01). Способ упрочнения гидрогелей / Лажко А.Э., **Бардакова К.Н.**, Шавкута Б.С., Паренаго О.О., Тимашев П.С., Свистушкин М.В., Юсупов В.И., Баграташвили В.Н.; заявитель и патентообладатель ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. – № 2017125524, заявл. 18.07.17; опубл. 06.07.2018, Бюл. № 19. – 6 с.

Тезисы:

Основные результаты работы были представлены на II Байкальском материаловедческом форуме (Улан-Удэ, 2015), VI Всероссийской конференции «Актуальные проблемы химии высоких энергий» (Москва, 2015), 69-й Всероссийской школе-конференции молодых ученых (Нижний Новгород, 2016), VIII школе-семинаре молодых ученых России «Проблемы устойчивого развития региона» (Улан-Удэ, 2016), VIII Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2016), 2 International Scientific Conference “Science of the Future” (Казань, 2016), Первом российском кристаллографическом конгрессе (Москва, 2016), VII Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2017» (Москва, 2017), Международной XLIII конференции Гагаринские чтения (Москва, 2017), Sechenov International Biomedical Summit (Москва, 2017, 2018); III, IV, VI междисциплинарном научном форуме «Новые материалы и перспективные технологии» (Москва, 2017, 2018, 2020), XX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2017), III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2017), VII международной конференции по фотонике и информационной оптике (Москва, 2018), Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы регенеративной медицины, инновации в репродуктологии» (Самара, 2018), II международной конференции «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (Екатеринбург, 2018), XVII Всероссийской молодежной научной конференции «Функциональные материалы: синтез, свойства, применение» (Санкт-Петербург, 2018), 18th International Conference on Chemistry and Physical Chemistry of Oligomers (Нижний Новгород, 2019), Всероссийской научной школе-семинаре «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине» (Саратов, 2019), VI Международной конференции «Аддитивные технологии: настоящее и будущее» (online, 2020), XVII Международной научно-практической

конференции «Новые полимерные композиционные материалы. Микитаевские чтения» (Нальчик, 2021).

Содержание диссертационного исследования Бардаковой Ксении Николаевны соответствует паспорту специальности 1.4.7. – «Высокомолекулярные соединения» по пункту 9 «Целенаправленная разработка полимерных материалов с новыми функциями и интеллектуальных структур с их применением, обладающих характеристиками, определяющими области их использования в заинтересованных отраслях науки и техники».

Диссертация «Влияние структуры и физико-механических свойств трехмерных биodeградируемых полимерных материалов на их биосовместимость и клеточную адгезию» Бардаковой Ксении Николаевны отвечает требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.7. – «Высокомолекулярные соединения».

Заключение принято на заседании Ученого совета ИФТ РАН ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. На заседании присутствовало 12 из 15 членов Ученого совета. Результаты голосования: «за»: – 11 чел., «против»: – 0 чел., «воздержались»: – 1 чел., протокол № 6/2023 от 18 декабря 2023 г.

Руководитель ИФТ РАН
ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН



В.И. Соколов

Ученый секретарь ИФТ РАН



В.В. Рочева