

ВІДГУК

офіційного опонента

завідувачки кафедри мікробіології та імунології

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету імені Тараса Шевченка,

докторки біологічних наук, професорки **СКІВКИ Лариси Михайлівни**

на дисертацію **САМОХІНА Євгена Олександровича**

на тему: «Оцінка біосумісності та антибактеріальної ефективності тривимірних волокнистих матеріалів з інкорпорованими наночастинками»,

подану на здобуття ступеня доктора філософії

в галузі знань 22 «Охорона здоров'я»

за спеціальністю 222 «Медицина»

Актуальність теми дисертації.

Хітозан є особливим типом екологічно прийняттого природного біополімеру завдяки його доступності, винятковим фізико-хімічним характеристикам та унікальній здатності взаємодіяти з білками, клітинами тощо. Нетоксичність, біосумісність, жорсткість структури та біорозкладність роблять його ідеальним субстратом для виготовлення біотехнологічних матеріалів широкого спектру призначення, серед яких найбільш перспективними є нановолокна. Найбільш відомим і широко використовуваним методом створення хітозанових нановолокон є електропрядіння - економічно ефективна та проста у використанні технологія, яка дозволяє виробляти майже необмежену кількість типів нановолокон із біологічних та синтетичних полімерів. Завдяки надзвичайно високій площі внутрішньої поверхні електропрядені хітозанові нановолокна знайшли широке застосування в багатьох галузях біомедицини: у фармакології як системи доставки ліків, у тканинній інженерії як вдосконалені

каркаси для регенеративної медицини, як матеріал для фільтрів, розподіленого культивування клітин тощо. Нановолокнисті хітозанові каркаси з архітектурою, що імітує природний позаклітинний матрикс, можуть забезпечувати велику площу поверхні для контакту та адгезії між клітинами та каркасом зі збереженням адекватного транспортування кисню і поживних речовин, що робить їх привабливим матеріалом для виготовлення ранових, гемостатичних та тромболітичних покривних матеріалів. Поєднання хітозану з синтетичними полімерами дозволяє подолати високу в'язкість його розчинів. Функціоналізація таких комплексів створює практично необмежені можливості формування нановолокнистих матеріалів на основі хітозану із заданими властивостями.

Процедура електроформування нановолокнистих матеріалів на основі хітозану є багатогранною завдяки унікальним властивостям цього полімеру в розчині, включаючи його полікатіонну природу та широкий діапазон молекулярних мас. Характеристики та компоненти технологічного процесу, такі як молекулярна маса, розчинники, напруга електричного поля та інші впливають на процес електроформування, якість та біологічні характеристики продукції.

Ключовими біологічними характеристиками електропрядених нановолокнистих хітозанових матеріалів є їх протизапальні та антимікробні властивості. Неконтрольоване запалення і, особливо, інфекційний процес ускладнюють регенеративні і репаративні процеси, надаючи їм хронічного характеру і знижуючи ефективність відновлення гомеостазу тканин. З огляду на це вдосконалення та оптимізація технологічного процесу електроформування нановолокнистих матеріалів на основі хітозану, спрямовані у т.ч. на створення продуктів з максимально високою антимікробною активністю є пріоритетними у даному науковому напрямку. Саме цим важливим питанням присвячена дисертаційна робота Самохіна Євгена Олександровича і саме вони визначають високий ступінь її актуальності за теоретичними і практичними аспектами.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами.

Дисертаційна робота виконана на базі Центру колективного користування науковим обладнанням медичного інституту Сумського державного університету відповідно до плану наукових досліджень Навчально-наукового медичного інституту Сумського державного університету в рамках проєктів за фінансуванням Міністерства освіти та науки України № 0120U101972 «Композитні нервові кондуїти для лікування критичних дефектів нервів на основі полімерних нанofібрил та струмопровідних матеріалів», № 0123U103300 «Впровадження 2D двошарових наномембран для керованої регенерації тканин при ендоперіодонтитах та периімплантиті» та № 0124U000552 «Визначення оптимальних параметрів нових нановолокнистих біоматеріалів з гемостатичними властивостями для невідкладної та військової медицини».

Оформлення дисертації та дотримання академічної доброчесності.

Рукопис дисертації Самохіна Євгена Олександровича написаний українською мовою і оформлений відповідно до наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» (із змінами, внесеними згідно з наказом Міністерства освіти і науки України № 759 від 31 травня 2019 року). Він має загальний обсяг 160 сторінок, з яких 129 сторінок займає основний текст. Рукопис має класичну структуру і включає анотації українською та англійською мовами, список публікацій (11 найменувань), зміст, перелік умовних скорочень, вступ, розділ "Огляд літератури" (який складається з трьох підрозділів), розділ "Матеріали та методи досліджень" (також з трьох підрозділів), розділ "Результати власних досліджень" (що має чотири підрозділи), розділ "Аналіз та обговорення результатів дослідження", висновки, список використаних джерел і додатки. Робота містить 43 рисунки, 1 таблицю та 3 додатки, а бібліографія складається з 214 джерел.

Дисертація має обґрунтовану концепцію, мета і завдання сформульовані чітко і лаконічно, рукопис написаний з використанням адекватної фахової термінології.

За результатами перевірки та аналізу матеріалів дисертаційної роботи Самохіна Євгена Олександровича не було виявлено ознак академічного плагіату, автоплагіату, фальсифікації. Запозичення, виявлені у роботі, оформлені коректно з посиланнями на першоджерела та не мають ознак порушення академічно доброчесності.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Дисертаційне дослідження Самохіна Євгена Олександровича виконано на високому методичному рівні з використанням комплексу сучасних методів аналізу. Зокрема, у дослідженні застосовувалися передові методики для вивчення структурних та фізико-хімічних властивостей матеріалів, включаючи сканувальну електронну мікроскопію, аналіз інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є, трансмісійну електронну мікроскопію, Раман-спектроскопію, спектроскопію втрат енергії електронів, 3D-візуалізацію мембран, визначення контактного кута мембран, а також дослідження статичної та динамічної деградації *in vitro*. Крім того, дослідження охоплювало оцінку біологічних властивостей матеріалів, зокрема антибактеріальних властивостей і цитотоксичності.

Статистичний аналіз результатів проводився з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism 9.1.1, що дозволило забезпечити високу точність обчислень і підтвердити достовірність отриманих даних.

Основні наукові досягнення, методики дослідження, висновки та практичні рекомендації, сформульовані в дисертації, є логічними, послідовними та достатньо обґрунтованими. Вони повністю відповідають поставленій меті та завданням дослідження, демонструючи високий рівень наукової роботи.

Наукові положення і висновки логічно випливають з отриманих

результатів, ґрунтуються на достатній кількості фактичного матеріалу, підтверджуються надійним статистичним аналізом, що підкреслює їх достовірність і наукову цінність.

Наукова новизна положень, результатів та висновків дисертаційної роботи.

Вперше були створені нові мембрани на основі хітозану, виготовлені методом електропрядіння з двома різними співвідношеннями розчинників TFA/DCM (7:3 та 9:1) і наступною нейтралізацією водними та спиртовими розчинами 1 М NaOH, 1 М Na₂CO₃, які підтримували адгезію та проліферацію клітин протягом 6 днів, показали хорошу біосумісність і ефективну антибактеріальну активність проти *S. aureus* та *E. coli*.

Розширено існуючі уявлення щодо ролі поліетиленгліколю у поліпшенні структурних і біологічних властивостей електропрядених мембран завдяки включенню полімолочної кислоти та поліетиленгліколю як співрозчинників у модифікацію хітозану. Після проведення пост-обробки було досягнуто підвищеної стабільності нановолокон хітозану у водних розчинах, що дозволило отримати гібридні волокнисті матеріали з помірною швидкістю деградації та зниженим рівнем гідрофобності.

Отримано нові дані стосовно антибактеріальних властивостей нановолокнистих матеріалів на основі хітозану. Вперше доведено, що електропрядені матеріали чинять бактеріостатичну дію як на планктонні форми бактерій, так і на їх біоплівки. Зокрема, швидкість зменшення кількості бактерій була вищою у нановолокон, виготовлених із системи співрозчинників TFA/DCM 9:1, що пояснюється включенням атомів фтору в полімерний ланцюг хітозану. Крім того, результати досліджень показали, що морфологічні властивості електропрядених волокон можуть впливати на утворення біоплівки на цих мембранах. Електропрядені мембрани пригнічували ріст мікроорганізмів у часовому проміжку до 6 годин, що свідчить про їх високий антиадгезивний потенціал і антибіоплівкову активність.

Було доведено, що інтеграція наночастинок срібла в ці мембрани підвищує і збалансовує їх дозозалежну антибактеріальну ефективність, починаючи з концентрації 25-50 мкг/мл проти *S. aureus* і *E. coli*.

Важливим аспектом новизни дисертаційного дослідження Є.О.Самохіна слід вважати порівняльну оцінку антибактеріальної активності розроблених матеріалів щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій, зважаючи на підвищений інтерес і дискутабельність цього аспекта біологічної дії нановолокнистих матеріалів на основі хітозану.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.

Результати дисертаційної роботи розширюють існуючі знання щодо методичних підходів до вдосконалення технології електропрядіння для отримання нановолокнистих матеріалів на основі хітозану.

Результати дослідження відкривають перспективи для створення нових матеріалів з покращеною антимікробною активністю, завдяки інкорпорації наночастинок металів. Такі матеріали можуть знайти широке застосування в розробці ранових та гемостатичних пов'язок, а також інших медичних виробів, що ефективно запобігають розвитку інфекційних ускладнень.

Крім того, ці результати можуть послужити основою для подальших досліджень і розробки новітніх матеріалів з покращеними антимікробними властивостями для використання у хірургії, стоматології, регенеративній медицині та інших біомедичних сферах, де контроль за інфекціями має вирішальне значення. Також ці матеріали можуть бути корисними в умовах, де ризик інфекцій є підвищеним, наприклад, у військовій медицині чи при наданні невідкладної допомоги.

Практичну цінність матеріалів дисертаційного дослідження засвідчує їх впровадження в навчальний та наукові процеси в центрі матеріалознавства (м. Київ), на кафедрі патологічної анатомії ННМІ Сумського державного університету (м. Суми), на кафедрі патологічної анатомії та судової медицини Полтавського державного медичного університету (м. Полтава).

Апробація результатів дисертації, повнота викладу основних положень, висновків і рекомендацій в опублікованих працях.

Основні результати дисертаційної роботи опубліковано у 11 наукових працях: 3 статтях у закордонних журналах, що індексуються наукометричною базою Scopus, та 8 тезах доповідей у матеріалах міжнародних науково-практичних конференцій, 2 з яких індексуються наукометричною базою Scopus. Це засвідчує визнання результатів дисертаційної роботи фаховою науковою спільнотою.

Основні здобутки дисертаційної роботи також достатньою мірою оприлюднені на 7 міжнародних наукових форумах.

Дискусійні положення, зауваження та запитання

1. У деяких підрозділах методичної частини відсутній детальний опис складу (або походження) поживних середовищ для культивування мікроорганізмів, а також (у деяких випадках) назви виробника приладів. Окремі репрезентативні ілюстрації гістологічних та імуногістохімічних препаратів містять недостатньо деталізовані позначки, що ускладнює сприйняття опису цих результатів дослідження. У рукописі наявні деякі термінологічні неточності.
2. Хоча Ви обговорюєте стабільність мембран *in vitro*, можливо, варто детальніше розглянути довготривалу поведінку цих мембран *in vivo*, зокрема їхню біодеградацію і взаємодію з тканинами протягом більш тривалого часу та після тривалого контакту з біологічними рідинами або під впливом різних умов навколишнього середовища.
3. Можливо, варто розширити порівняння Ваших матеріалів з іншими існуючими антимікробними та рановими покриттями, щоб підкреслити переваги та можливі обмеження розроблених мембран у контексті клінічного використання.
4. У роботі обговорюються запальні реакції на ранніх етапах загоєння, але було б корисно докладніше обговорити, як мембрани з хітозану

впливають на різні аспекти запальної імунної відповіді (наприклад, активація макрофагів, утворення рубцевої тканини), зважаючи на дослідження у роботі CD163-позитивних клітин.

5. Було б корисно більш докладно обговорити механізми, за допомогою яких наночастинки срібла можуть проявляти цитотоксичні ефекти на клітини ссавців. Яким чином ці ефекти можна мінімізувати для забезпечення безпеки біомедичних застосувань?
6. Більш детальне дослідження взаємодії між наночастинками срібла та іншими компонентами мембран могло б дати уявлення про те, як ці взаємодії впливають на загальну ефективність і стабільність матеріалів.

Слід зазначити, що висловлені зауваження не носять принципового характеру, не стосуються концепції дисертаційного дослідження і не впливають на його загальну позитивну оцінку.

У порядку дискусії до автора виникли наступні **запитання**:

1. З огляду на майбутнє практичне застосування виготовлених матеріалів дослідження того, як різні умови зберігання (температура, вологість) можуть впливати на стабільність та ефективність мембран, може бути важливим для їх практичного використання. Чи можете Ви прогнозувати умовний термін придатності (тривалість активності) Ваших зразків?

2. Які додаткові біополімери могли б бути використані у комбінації з хітозаном для покращення механічних характеристик нановолокон? Які впливи на клітинну адгезію можуть мати модифікації хітозанових мембран з використанням цих додаткових біополімерів?

3. Які методи можна запропонувати для подальшого вдосконалення стабільності нановолокон у водних середовищах?

4. Маркерами для яких клітин імунної системи були використані у дослідженні CD68, CD163 та мієлопероксидаза? Чи можете Ви коротко прокоментувати вплив розроблених матеріалів на резолюцію запалення?

Висновки про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Самохіна Євгена Олександровича «Оцінка біосумісності та антибактеріальної ефективності тривимірних волокнистих матеріалів з інкорпорованими наночастинками» є завершеною кваліфікаційною науковою працею, яка за актуальністю тематики, високим методичним рівнем, ступенем новизни отриманих результатів та їх практичним значенням, повнотою викладення отриманих даних в опублікованих наукових працях повністю відповідає вимогам п. 6, 7, 8, 9 «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12.01.2022 року, а її автор Є.О.Самохін заслуговує присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина».

Офіційний опонент:

Докторка біологічних наук, професорка

Завідувачка кафедри мікробіології та імунології

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка

Міністерства охорони здоров'я України



Лариса СКІВКА



Підпис Сківки Л.М. засвідчую
проректор з науково-педагогічної
роботи
Андрій ГОЖИК