

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Шимборської Яни Андріївни «Формування двошарових біологічно активних прищеплених полімерних покриттів», представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 102 Хімія, Галузь знань 10 Природничі науки

Актуальність теми

Нові тенденції досліджень в галузі полімерної хімії, біоінженерії та нанохімії вимагають створення «розумних» полімерних систем, здатних реагувати на зовнішню дію оборотною зміною структури, фізичних або хімічних властивостей. Одним з важливих напрямків розвитку сучасної полімерної хімії є модифікація твердих неорганічних та органічних поверхонь для надання їм спеціальних властивостей, а саме – прищеплених (ко)полімерних щіток, чутливих до дії зовнішніх чинників, способів їх функціоналізації та модифікації біологічно активними молекулами/макромолекулами, властивостей та їх можливих застосувань. Це відкриває нові можливості для створення матеріалів для розвитку клітинної інженерії, біотехнології, наномедицини, у якості засобів доставки лікарських препаратів, діагностики захворювань тощо. Введення металевих або напівпровідникових наночастинок у полімерні системи відкриває нові шляхи для конструювання композиційних матеріалів, що володіють унікальними механічними, електричними або оптичними властивостями.

Незважаючи на великий прогрес у сфері створення полімерних систем, чутливих до дії зовнішніх чинників для високотехнологічних біомедичних технологій, все ще існують деякі обмеження в їх використанні. Необхідно вирішувати фундаментальні питання, такі як біосумісність, селективність дії, стабільність, тривалість та багаторазове використання, багатофункціональність, а також враховувати, за яких умов відбувається перехід властивостей. Це вимагає розробки нових наукових та технологічних підходів до створення чутливих полімерних систем.

Отже, актуальність теми дисертаційної роботи Яни Шимборської зумовлена як викликами часу, так і водночас спрямована на з'ясування важливих питань фундаментального характеру. Зокрема, таких як стан речовини в інтерфазі (межі поділу фаз), роль поверхневих властивостей цієї інтерфазу у прояві фізико-хімічних та колоїдно-хімічних властивостей, які зумовлюють здатність до адсорбції білків, гідрофільно-гідрофобного балансу, показника заломлення та ін. Зміна температури на декілька градусів чи незначні зміни у рН дозволяють суттєво (у десятки разів) змінювати властивості таких поверхневих шарів, їхню морфологію, механічні властивості тощо.

Дисертація Яни Шимборської виконана на кафедрі органічної хімії Інституту хімії і хімічних технологій Національного університету "Львівська політехніка". Тема дисертаційної роботи відповідає науковому напрямку кафедри, а саме «Створення функціональних полімерів та наноматеріалів» і безумовно є

черговим успіхом наукової школи цієї кафедри. Участь авторки дисертаційної роботи на всіх етапах виконання експериментальних досліджень і підготовки дисертації була ключовою. Вона особисто здійснила синтез і дослідження властивостей «розумних» наночарів прищеплених кополімерних щіток, а також двошарових біологічно активних поверхонь, дослідила цитосумісність наночарів, їх здатності впливати на морфологію клітин. Частина експериментальних результатів була отримана здобувачкою в Ягеллонському університеті (Польща) та в Гентському університеті (Бельгія).

Головною метою цієї роботи було створення двошарових прищеплених покриттів, що зберігають термочутливі властивості, оскільки без цієї важливої характеристики їхнє використання було б обмежене. Ключову роль у цій задачі відіграють властивості та товщина другого шару на основі наногелю. Вони мають бути так підібрані, щоб не відбувалося блокування конформаційних змін першого прищепленого шару на основі кополімерних щіток, але, при цьому, змінювалися змочуваність та шорсткість двошарових покриттів, вводилися функціональні групи або специфічні сполуки, що в кінцевому рахунку покращували б адгезію та проліферацію клітин.

Аналіз змісту дисертаційної роботи

Основний зміст роботи викладений на 144 сторінках друкованого тексту, містить 7 таблиць та 52 рисунки. Дисертаційна робота має класичну будову – складається із вступу, 5-ти розділів, висновків та списку використаної літератури. Список літературних джерел налічує 162 найменування.

Перший розділ дисертації присвячений огляду літератури з методів синтезу «розумних» полімерних систем, зокрема, прищеплених (ко)полімерних щіток, чутливих до дії зовнішніх чинників, способів їх функціоналізації та модифікації біологічно активними молекулами/макромолекулами. Наведена класифікація полімерних систем, чутливих до дії зовнішніх чинників, викладені сучасні уявлення про температуро- та рН-чутливі прищепленні полімерні щітки, їх конформації, методи функціоналізації та модифікації прищеплених полімерних щіток.

Показана можливість застосування прищеплених полімерних систем в нано- і мембранних технологіях, для стабілізації колоїдних систем, в електроніці, для вирощування тканин та тканинної інженерії, що може допомогти в розробці новітніх біоінтерфейсів для біомедичних та біотехнологічних застосувань.

У другому розділі наводяться методи формування та функціоналізації двошарових полімерних покриттів на основі 3-амінопропілтриетоксисилану (APTES) та 2-бромізообутирилброміду на поверхні скла.

Авторка достатньо кваліфіковано представила сучасні і новітні методики досліджень – хімічні методи аналізу, елементний аналіз, раманівська спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія, часопротітна вторинна йонна мас-

спектрометрія, рентгенівська фотоелектронна спектроскопія, еліпсометрія, атомно-силова мікроскопія, визначення контактного кута змочування, калориметричний метод аналізу, фарбування живих/мертвих клітин, імунофлюоресцентний аналіз.

У **третьому розділі** методом радикальної полімеризації від поверхні з перенесенням атому (ATRP) синтезовано наношари прищеплених щіток на основі P(OEGMA188-co-AAm) з різним мольним співвідношенням фрагментів мономерів у складі кополімерної щітки. Формування (ко)полімерних щіток було підтверджено за допомогою методів часопротіної вторинної йонної мас-спектрометрії ToF-SIMS та рентгенівської фотоелектронної спектроскопії XPS. Отримані температуро- та рН-чутливі (ко)полімерні щітки можуть бути використані у біомедицині для вивільнення біологічно активних речовин, контролю кількості бактерій та адсорбції білків, адгезії та відшаровування клітинних шарів. Перевагами цих наношарів є більш виражена температурозалежна відповідь змочуваності поверхні, одночасна чутливість і до зміни температури, і до рН буферів, розширення області застосування прищеплених щіток.

У **четвертому розділі** представлені результати висіювання дермальних фібробластів на температуро-чутливих прищеплених (ко)полімерних щітках та проведення біологічних тестів, характеристика їхньої відповіді на зменшення температури поверхні покриттів як одного з методів неінвазивного впливу на морфологію та відшаровування фібробластів. Описано біосумісні властивості першого прищепленого наношару на основі (ко)полімерних щіток з використанням дермальних фібробластів людини (HDFn) та можливість маніпулювати морфологією клітин за різних температур. Результати підтвердили, що жоден з видів (ко)полімерних щіток не є цитотоксичним для дослідженої клітинної лінії, але морфологія клітин в значній мірі залежить від хімічного складу покриття. (Ко)полімерні щітки на основі POEGMA, PNIPAM, P(NIPAM-co-HEMA) сприяють культивуванню фібробластів, утворюючи моношар клітин після 168 годин культивування. Описана залежність життєздатності фібробластів від контактного кута змочування щіток та їхньої шорсткості для 24 та 72 год інкубування.

Проведені експерименти виявили численні переваги створених дисертанткою термочутливих щіток. Щітки продемонстрували різні механізми термочутливості, що важливо для наступних досліджень з метою вивчення молекулярних механізмів теплової відповіді. В розділі показано, як можна змінювати температуру переходу покриттів, змінюючи їхній склад. Біосумісність одержаних наношарів з фібробластами людини робить прищеплені щітки перспективними кандидатами для тканинної інженерії.

П'ятий розділ присвячений формуванню двошарових біологічно активних прищеплених полімерних покриттів шляхом модифікації першого наношару ковалентно прищепленими біологічно активними наношарами на основі 4-ArmPEG15K та 4-ArmPEG15K + PEG-3APT, зшитих у полімерну

матрицю з гелеподібною структурою. Хімічний склад двошарових покриттів охарактеризований з допомогою раманівської спектроскопії, а товщина методом еліпсометрії. Дослідження впливу часу модифікації на збереження температурочутливих властивостей двошарових полімерних покриттів показало, що з часом інтенсивність LCST-подібного переходу зменшується.

В розділі описані в'язкоеластичні властивості клітин, висіяних на двошарових покриттях на основі 4-ArmPEG15K та 4-ArmPEG15K + PEG-3APT і інкубованих протягом 48 годин, а саме залежності модулів накопичення та втрат енергії в залежності від частоти осциляції наконечника атомно-силового мікроскопу. Встановлено, що двошарові полімерні покриття на основі 4-ArmPEG15K сприяли адгезії та проліферації клітин PANC-1, а покриття на основі 4-ArmPEG15K + PEG-3APT володіли неоптимальними властивостями для культивування цієї клітинної лінії. Окреслені перспективи застосування двошарових покриттів у біомедицині та безкаркасній тканинній інженерії.

В результаті проведення комплексних досліджень з пошуку та застосування нових «розумних» полімерних прищеплених наношарів на неорганічних поверхнях, які містять у складі макроланцюги полімерних щіток (перший прищеплений наношар) модифіковані біологічно активним наношаром (другий прищеплений наношар) для вирощування на них клітин та контролю за їх морфологією. При цьому *вперше* створено нові двошарові прищеплені наношари з покращеними властивостями, які дають змогу вирощувати на них тканини; контрольовано змінювати морфологію клітин та відщеплювати їх від поверхні.

Наукова новизна

Вперше розроблено процес формування на поверхнях амінованого скла нових «розумних» (ко)полімерних прищеплених наношарів, які складаються з макроланцюгів полімерних щіток, одержаних методом радикальної полімеризації «від поверхні» наступних мономерів: а) метилового етеру диетиленглікольмонометакрилату та акриламідю; б) N-ізопропілакриламідю та 2-гідроксіетилметакрилату; в) метилового етеру диетиленглікольмонометакрилату та 2-гідроксіетилметакрилату; Досліджено їх хімічну структуру та фізико-хімічні властивості. При цьому *вперше* створено нові двошарові прищеплені наношари для вирощування на них тканин; контрольованої зміни морфології клітин та відщеплення від поверхні клітин.

Вперше досліджено одночасний вплив температури та рН на змочуваність, товщину та морфологію прищеплених кополімерних наношарів з різною хімічною будовою (співвідношенням кономерів). Вперше досліджено процес формування двошарових прищеплених біологічно активних наношарів на основі багатофункціональних спиртів/амінів на поверхні температурочутливих прищеплених кополімерних щіток.

Вперше досліджено вплив часу модифікації на товщину та термочутливі властивості двошарових полімерних покриттів.

Практичне значення роботи

Розроблені методи синтезу нових двошарових прищеплених наношарів можуть бути використані у багатьох галузях сучасних нанобіотехнології та біомедицини для вирощування на них тканин, оскільки володіють високими цитосумісними властивостями. Отримані наношари можуть бути використанні у хірургії та тканинній інженерії для отримання неушкоджених нанолістів тканинної природи.

Отримані температуро- та рН-чутливі (ко)полімерні щітки можуть бути використані у біомедицині для вивільнення біологічно активних речовин, контролю кількості бактерій та адсорбції білків, адгезії та відшаровування клітинних шарів. Перевагами цих наношарів є більш виражена температурозалежна відповідь змочуваності поверхні, одночасна чутливість і до зміни температури, і до рН буферів, розширення області застосування прищеплених щіток.

Достовірність отриманих результатів та обґрунтованість висновків.

Отримані в дисертації Я. А. Шимборської наукові результати, положення і висновки є *новими, теоретично і експериментально обґрунтованими*, оскільки ґрунтуються на достатньо великому масиві експериментальних даних, отриманих з використанням різних хімічних, фізико-хімічних та фізичних методів дослідження і проаналізованих на основі фундаментальних засад хімії високомолекулярних сполук та фізико-хімії полімерів з урахуванням сучасного стану проблеми в цій галузі та світового досвіду.

Достовірність і обґрунтованість отриманих результатів підтверджується їх доброю відтворюваністю, взаємною узгодженістю даних, отриманих з використанням взаємодоповнюючих методів дослідження, високим рівнем і обсягом наукових публікацій, успішною апробацією матеріалів дисертації на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях.

Повнота викладення результатів в опублікованих працях

Основні наукові результати дисертації повною мірою висвітлені у 20 публікаціях, зокрема. 5 статтях у фахових міжнародних та вітчизняних періодичних виданнях, що входять до наукометричних баз. Міждисциплінарний характер роботи та практичне використання її результатів підтвержені публікаціями у журналах біомедичного спрямування, хімічної інженерії поверхні та ін. Робота широко апробована на міжнародних та вітчизняних конференціях, симпозіумах, опубліковано 15 тез доповідей.

Все це дає підстави вважати, що дисертаційна робота Шимборської Я. А. відображена у публікаціях високого рівня, які за кількісними ознаками відповідають існуючим кваліфікаційним вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Зауваження і побажання до роботи:

1. У вступі до роботи не вказано, чи була ця дисертація пов'язана з виконанням конкретних наукових тем чи грантів?
2. В дисертації не зовсім вдало сформульовано об'єкт дослідження, перераховані об'єкти дослідження, а не «процес або явище, що породжує проблемну ситуацію в певній галузі знань і обраний для вивчення». Краще було би написати «об'єктом дослідження є закономірності (або механізм) утворення нових прищеплених полімерних двошарових наноструктур на неорганічних поверхнях, які містять макроланцюги полімерних щіток, модифіковані біологічно активним наночастиною, для вирощування на них клітин та контролю за їх морфологією».
3. Підсумком літературного огляду (Розділ 1), як правило, є висновки з літературного огляду і формулювання на цій основі мети роботи. На жаль, в роботі цього немає. В кінці кожного розділу (3-5) теж варто би було провести узагальнення отриманих результатів як підсумки.
4. В методичній частині роботи (Розділ 2) не вказано характеристики і походження вихідних речовин, що є важливою складовою дисертації з хімічних наук.
5. Встановлено суттєву різницю між мольним співвідношенням мономерів у вихідній реакційній суміші і в полімерній плівці (Таблиця 3.2). Особливо помітно «аномальну» залежність для зразків 3 і 4. Чому так відбувається?
6. Важливо обґрунтувати, чи не була температура 10 °C занадто низькою для клітин у експерименті зі зміною морфології фібробластів та їх відриванням? Клітини могли померти та відшаруватися. Яка температура переходу була би ідеальною для застосування у тканинній інженерії?
7. На рис. 4.1, 4.3, 5.7, 5.8 і 5.9 наведені мікрофотографії, отримані за допомогою оптичного та флуоресцентного мікроскопів. На жаль, ні кратність збільшення, ні масштабування зображення не наведені і розміри об'єктів неможливо оцінити.
8. Дисертація написана належною науковою мовою, позаяк зустрічаються невдалі вислови, такі як «функційні групи» (С.22, 25), «частки» замість «частинки», а також граматичні помилки (С.29, С.26, 26, 61, 125 та ін.), на рис. 3.2. відсутні позначення рисунків а, b і с.

Висловлені зауваження мають переважно характер побажань і ні в якій мірі не знижують загальної наукової цінності роботи, яка виконана на високому експериментальному і теоретичному рівні.

Висновок про відповідність дисертації вимогам МОН

Аналіз дисертаційної роботи Яни Шимборської дозволяє дійти висновку, що робота за своєю актуальністю знаходиться на вістрі світової науки. Маючи чітке підґрунтя попередніх досліджень, дисертація виконана як дуже сучасна, новаторська робота, основана на кращих традиціях хімії високомолекулярних сполук з використанням найновіших нанотехнологічних підходів. Дисертація має міждисциплінарне значення, оскільки її результати можуть бути використані в інших галузях науки і техніки, таких як біотехнології, нанохімія, хімія композиційних матеріалів, хімія та клітинна інженерія та інші.

Робота є завершеним в рамках поставлених завдань дисертаційним дослідженням, в якому отримані нові, науково обґрунтовані результати, що вирішують проблему розроблення наукових і практичних основ синтезу «розумних» наночарів на основі температуро- та рН-чутливих прищеплених полімерних щіток на неорганічних поверхнях, що має істотне значення для хімії високомолекулярних сполук, а також вносить помітний вклад у фізико-хімію полімерів, нанохімію, біоінженерію і хімію поверхні, технологію композиційних матеріалів.

Дисертація «Формування двошарових біологічно активних прищеплених полімерних покриттів» за актуальністю, новизною, науковим рівнем, обсягом отриманих результатів та глибиною їхнього аналізу відповідає наказу МОН України № 40 від 12.01.2017р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», а також відповідає вимогам пунктів 6, 7, 8 і 9 «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 від 12 січня 2022 року № 44 зі змінами і доповненнями, а також вимогами регламентуючих документів Міністерства освіти і науки України до дисертацій доктора філософії, а авторка дисертаційного дослідження Шимборська Яна Андріївна заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 10 «Природничі науки» за спеціальністю 102 «Хімія».

Офіційний опонент:

Доктор хімічних наук, професор, головний науковий співробітник кафедри фізичної та колоїдної хімії Львівського національного університету імені Івана Франка

О.І. Аксіментьєва

Підпис д.х.н., проф. Аксіментьєвої О.І. засвідчую:
Вчений секретар
Львівського національного університету імені
Івана Франка, доцент



О.С. Грабовецька