

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию на соискание ученой степени доктора химических наук

Балабушевич Надежды Георгиевны

на тему: «Микрокапсулирование белков с использованием наноструктурированных матриц и послойной адсорбции полиэлектrolитов»
по специальности 1.5.6. – «Биотехнология»

Процессы формирования мультислойных полиэлектrolитных нано- и микрокапсул с начала XXI века привлекают пристальное внимание исследователей различных научных групп. Послойная адсорбция разноименно заряженных полиэлектrolитов в отличие от многочисленных известных методов иммобилизации характеризуется простотой используемой техники и проводится в водных растворах и мягких условиях, что позволяет капсулировать биологически активные вещества различной природы. Несмотря на значительное количество работ по использованию названной техники вопросы иммобилизации лабильных белковых препаратов освещены недостаточно, кроме этого, продолжается поиск новых нано- и микроматриц с высоким содержанием белка, пригодных для послойной адсорбции полиэлектrolитов, и природных полимеров, способных придать новые свойства мультислойным частицам и расширить области их возможного использования. В этой связи диссертационная работа Балабушевич Надежды Георгиевны «Микрокапсулирование белков с использованием наноструктурированных матриц и послойной адсорбции полиэлектrolитов», выполненная в МГУ имени М.В. Ломоносова на кафедре химической энзимологии химического факультета по специальности 1.5.6. – «Биотехнология» является актуальной.

Цели представленного исследования заключались в создании направления, связанного с микрокапсулированием белков с помощью послойной адсорбции полиэлектrolитов с использованием наноструктурированных матриц, а также в развитии подходов к получению мультислойных рН-чувствительных контейнеров для доставки белков или стабильных биореакторов с высоким сохранением активности ферментов.

Диссертационная работа Балабушевич Н.Г. традиционно построена и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы и список публикаций автора по теме представленной работы.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, представлены положения, выносимые на защиту. Обзор литературы включает три подраздела. Подраздел 1.1. посвящен технике послойной адсорбции полиэлектролитов и способам включения белков в мультислойные полиэлектролитные частицы. Подраздел 1.2. знакомит с возможностями использования микросфер ватерита в качестве матриц для капсулирования белка с использованием многослойной адсорбции. Особое внимание уделено применению различных полимеров для создания гибридных микросфер ватерита с новыми морфологическими и физико-химическими свойствами. В подразделе 1.3. обобщены известные сведения о строении, свойствах и перспективах применения муцина, а также рассмотрены основные пути повышения биодоступности белков при мукозальной, в том числе пероральной доставке. Стимул-чувствительные свойства и перспективы практического применения полиэлектролитных микрочастиц описаны в подразделе 1.4. В последнем подразделе обзора литературы 1.5. сделаны выводы из обзора литературы, обоснован выбор использованных в работе матриц, полиэлектролитов и белковых препаратов.

В разделе «Материалы и методы исследования» подробно описаны основные методики получения матриц и полиэлектролитных капсул, иммобилизации белков, физико-химического анализа микрочастиц, определения содержания белков и активности ферментов, а также методы работы с клетками крови и лабораторными животными.

Раздел «Обсуждение и результаты» состоит из трех подразделов. Подраздел 2.1 посвящен разработке подходов к микрокапсулированию с использованием новых матриц, сформированных с использованием высаливания и образования нерастворимых полиэлектролитных комплексов

белков, рассмотрению иммобилизации одиннадцати белковых препаратов, относящихся к различным классам с использованием послойной адсорбции полиэлектролитов на нерастворимых комплексах высокомолекулярных декстрансульфата и хитозана, исследованию физико-химических и биологических свойств мультислойных частиц с инсулином, способствующих повышению биодоступности гормона при пероральной доставке мультислойных частиц. Подробно рассмотрены вопросы анализа мукоадгезивных, защитных и кальций связывающих свойств полиэлектролитных частиц. Особое внимание уделено совместному капсулированию белковых ингибиторов протеаз (апротинина, ингибитора Баумана-Бирк из сои) для защиты от действия основных протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта целевых белков на примере инсулина и его рекомбинантных мономерных и быстродействующих аналогов аспарт и лизпро. Подраздел 2.2. обобщает подходы и рекомендации к микрокапсулированию белков, ферментов и известных биферментных систем на популярных растворимых матрицах в виде меламинаформальдегидных ядер и мезопористых микросфер ватерита как для обеспечения максимального содержания белка, так и сохранения биологической активности иммобилизованных лабильных препаратов. В подразделе 2.3. описаны подходы к использованию муцина для анализа мукоадгезивных свойств микросфер ватерита, для включения в микросферы ватерита с помощью сорбции и соосаждения, для послойной адсорбции полиэлектролитов и создания гибридных микросфер ватерита с гликопротеином, обладающих новыми свойствами для использования в системах доставки биологически активных соединений.

В диссертационной работе Балабушевич Н.Г. выявлена взаимосвязь строения наноструктурированных мультислойных микросистем, свойств полиэлектролитов и способов включения белковых препаратов с проявлением биологической активности лабильных белков и ферментов.

В исследовании предложено и оптимизировано получение наноструктурированные матриц с высоким содержанием белка в виде

высоленных микроагрегатов и нерастворимых полиэлектролитных комплексов с полианионами, позволяющих при послойной адсорбции полимеров и последующей обработке ультразвуком создать стабильные нано- и микрочастицы с рН-чувствительными свойствами, зависящими от природы белков и биополимеров, условий формирования частиц, количества и структуры полиэлектролитных слоев. Использование нерастворимых полиэлектролитных комплексов белков в качестве матриц является более универсальным процессом матриц, так как позволяет работать при более низких ионных силах растворов и использовать широкий круг биополиэлектролитов с различной плотностью заряда и белковых препаратов, в том числе не способных к осаждению с помощью высаливания.

Для микрочастиц, полученных с использованием декстрансульфата 500 кДа и мукоадгезивного хитозана 400 кДа, показано пролонгированное, рН-зависимое высвобождение белков, зависящее от их изоэлектрической точки и количества полиэлектролитных слоев, а также наличие мультифункциональных свойств (защитных, кальций связывающих, мукоадгезивных), способствующих повышению биодоступности белковых препаратов при мукозальной доставке. Биодоступность микрокапсулированных белков на примере инсулина человека была подтверждена в опытах на здоровых животных и животных с диабетом в остром и хроническом экспериментах по понижению уровня глюкозы и наличию гормона плазме крови.

В работе предложены рекомендации по выбору и включению в мультислойные микрочастицы белковых ингибиторов протеаз для дополнительной защиты целевых белков от действия основных протеолитических ферментов в различных участках желудочно-кишечного тракта человека (пепсина желудка, трипсина и химотрипсина соков поджелудочной железы и тонкого кишечника).

При сравнении иммобилизации белковых препаратов в полиэлектролитные микрокапсулы путем предварительного включения в мезопористые микросферы ватерита с помощью адсорбции и соосаждения или

сорбцией в готовые матриксные и полые микрокапсулы были предложены подходы, обеспечивающие высокое содержание белков и максимальное сохранение удельной активности рН-чувствительных ферментов в мультислойных препаратах. Впервые определены параметры равновесной адсорбции белков с различными физико-химическими свойствами на микросферах ватерита с использованием моделей Ленгмюра, Фрейндлиха и Брунауэра-Эммета-Теллера. Обоснованы механизмы включения белков в микросферы ватерита при адсорбции и соосаждении, а также их высвобождения за счет перекристаллизации частиц в более стабильную полиморфную форму - кальцит. Рекомендованы условия позволяющие увеличить удельную активность лабильных иммобилизованных ферментов при соосаждении при более низких значениях рН за счет проведения процесса в буферном растворе.

Включение оксидоредуктазных биферментных систем (глюкозооксидаза/пероксидаза и глюкозооксидаза/каталаза) в готовые мультислойные микрокапсулы и их функционирование при анализе содержания глюкозы свидетельствовали о перспективности использования иммобилизации для создания микрокапсулированных мультиферментных каталитических систем.

При адсорбции гликопротеина муцина из желудка свиньи на поверхности мультислойных полиэлектролитных микрокапсул и микросфер ватерита впервые оценены мукоадгезивные свойства препаратов. При добавлении гликопротеина при формировании микросфер ватерита впервые сформированы гибридные микросферы с муцином, обладающие по сравнению с контрольными микросферами ватерита повышенной стабильностью, более высокой площадью поверхности, существенно меньшим размером пор и нанокристаллитов. Гибридные микросферы с муцином лучше включали и пролонгировано высвобождали положительно заряженные белки и низкомолекулярные лекарственные вещества. Показано, что концентрация муцина при формировании гибридных микросфер может быть использована как для регулирования включения и высвобождения положительно

заряженных биологически активных соединений, в том числе низкомолекулярного антрациклинового антибиотика доксорубина, так и управления перекристаллизацией частиц в кальцит. Исследование биологических свойств гибридных микросфер с муцином с компонентами крови показало, в сравнении с контрольными микросферами ватерита, меньшее связывание белков плазмы, отсутствие повреждения мембран эритроцитов и большую способность стимулировать продукцию активных форм кислорода нейтрофилами. Совокупность данных по включению и высвобождению белковых препаратов и антибиотика, анализа биосовместимости позволяет предположить возможность использования гибридных микросфер ватерита с муцином, даже без нанесения полиэлектролитных слоев, в качестве комплексных средств пролонгированной доставки биологически активных веществ.

Основные положения и выводы диссертационного исследования в полной мере изложены в одном патенте и 46 научных статьях, опубликованных Балабушевич Н.Г. в рецензируемых научных изданиях, из которых 39 статей в изданиях, индексируемых в Scopus, Web of Science и определенных п. 2.3 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, и 5 статей в изданиях, индексируемых в РИНЦ. 17 статей автора напечатаны в журналах первого квартиля, 12 статей - в журналах второго квартиля.

Достоверность полученных Балабушевич Н.Г. результатов подтверждается использованием в работе современных физико-химических методов исследования, включая сканирующую электронную и конфокальную лазерную микроскопии, динамическое светорассеяние, рентгенофазовый анализ, адсорбцию-десорбцию азота по Брунауэру-Эммету-Теллеру, круговой дихроизм, ИК-Фурье и Рамановскую спектроскопию, и анализа белков и полимеров, а также применением при обработке и интерпретации результатов измерений стандартных и принятых в мировой научной практике методик и теоретических положений.

В результате проведенной Балабушевич Н.Г. работы было разработано направление, связанное с микрокапсулированием белков с использованием техники послойной адсорбции полиэлектролитов, а также предложены, обоснованы и реализованы подходы к иммобилизации белковых препаратов с различными физико-химическими свойствами в мультислойные микрокапсулы с использованием наноструктурированных матриц для получения контейнеров с рН-чувствительным высвобождением белков и стабильных биореакторов с высоким сохранением активности иммобилизованных ферментов.

По работе имеются некоторые замечания.

- 1. Не на всех рисунках указан доверительный интервал значений.*
- 2. Для использованных хитозанов не полностью указаны их характеристики (например индекс полидисперсности), что затрудняет корректно анализировать результаты.*
- 3. Не совсем понятно использование хитозана от Российского Хитинового общества?*
- 4. Имеются опечатки. Например, на стр. 60 напечатано И.Ю. Овчинников вместо Ю.А. Овчинников*

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.6. – «Биотехнология» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Таким образом, соискатель Балабушевич Надежда Георгиевна заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.6. – «Биотехнология».

Официальный оппонент:

Доктор химических наук,
профессор,
главный научный сотрудник лаборатории инженерии биополимеров
Института биоинженерии имени К.Г. Скрыбина
Федерального исследовательского центра
"Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук

Варламов Валерий Петрович

Контактные данные:
тел.: +7 (499)135-65-56
e-mail: varlamov@beigi.ac.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.00.23 – Биотехнология

Адрес места работы:
117312 Москва, пр. 60-летия Октября д.7, к.1
Институт биоинженерии имени К.Г. Скрыбина Федерального
исследовательского центра "Фундаментальные основы биотехнологии"
Российской академии наук

Подпись В.П. Варламова заверяю