

## 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 полиэлектролитов»  
по специальности 1.5.6. – «Биотехнология»

Диссертационная работа Балабушевич Н.Г. построена по традиционной схеме и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы и список публикаций автора по теме работы. Диссертация изложена на 214 страницах, содержит 132 рисунка, 46 таблиц, 394 ссылки.

Во введении обоснована актуальность темы работы, сформулированы цель и задачи исследования, показаны научная новизна и практическая значимость полученных результатов, представлены положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из трех подразделов. В разделе 1.1. изложены особенности техники послойной адсорбции полиэлектролитов и проанализированы три способа включения белков в мультислойные полиэлектролитные частицы. В подразделе 1.2. описано использование микросфер ватерита в качестве матриц для послойной адсорбции полиэлектролитов, различные пути включения белков в микросферы ватерита, а также создание гибридных микросфер ватерита с использованием полимеров природного происхождения или их производных. Подраздел 1.3. посвящен мукозальной доставке белков и включает описание свойств основного компонента всех слизистых поверхностей гликопротеина муцина и перспектив его использования при создании средств доставки биологически активных соединений. Кроме этого, подробно рассмотрены пути повышения биодоступности белков при мукозальной, в том числе пероральной доставке. В разделе 1.4 рассмотрены перспективы практического использования стимул-чувствительных мультислойных

частиц для доставки биологически активных соединений, в том числе направленной доставки, и трудности использования препаратов, полученных послойной адсорбции полиэлектролитов. В подразделе 1.5. «Выводы по обзору литературы, постановка задачи и обоснование объектов исследования» освещены вопросы выбора матриц, полиэлектролитов и одиннадцати белковых препаратов, использованных в работе.

В разделе «Материалы и методы исследования» подробно описаны методики получения матриц и полиэлектролитных частиц с белковыми препаратами, анализа содержания и активности использованных препаратов и работы *in vitro* и *in vivo*.

Раздел «Обсуждение и результаты» включает три подраздела. Подраздел 2.1 посвящен разработке подходов к микрокапсулированию с использованием новых матриц, сформированных с использованием высаливания и образования нерастворимых полиэлектролитных комплексов белка, рассмотрению иммобилизации белковых препаратов, относящихся к различным классам с использованием послойной адсорбции полиэлектролитов на нерастворимых комплексах высокомолекулярных декстрансульфата и хитозаном, исследованию физико-химических и биологических свойств *in vivo* 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 с белками. Особое внимание уделено совместному капсулированию белковых ингибиторов протеаз (апротинина, ингибитора Баумана-Бирк из сои) для защиты целевых белков на примере инсулина и его рекомбинантных мономерных и быстродействующих аналогов аспарт и лизпро от действия основных протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта. Подраздел 2.2. обобщает подходы и рекомендации к микрокапсулированию белков, ферментов и известных мультиферментных систем на популярных растворимых матрицах в виде

меламинформальдегидных ядер и мезопористых микросфер ватерита как для обеспечения максимального содержания белка, так и сохранения биологической активности иммобилизованных лабильных ферментных 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, обладающих новыми свойствами.

Метод послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов (метод *layer-by-layer*), активно развиваемый с конца XX века, отличается простотой используемой техники и осуществляется в мягких условиях, что позволяет его использовать для иммобилизации биологически активных соединений. Несмотря на огромное количество научных публикаций вопросы иммобилизации лабильных белков и ферментов с использованием техники послойной адсорбции полиэлектролитов зачастую освещены недостаточно, что приводит к трудностям при их капсулировании. Продолжается поиск новых нано- и микроматриц с высоким содержанием белка, пригодных для послойной адсорбции полиэлектролитов, и природных полимеров, способных придать новые свойства мультислойным капсулам. Перечисленные факты обуславливают актуальность представленного исследования.

Цели работы заключались в создании важного направления, связанного с микрокапсулированием белков с помощью послойной адсорбции полиэлектролитов 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.

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 предложены и проанализированы наноструктурированные матрицы с высоким содержанием белка в виде высоленных микроагрегатов и нерастворимых комплексов с полианионами, позволяющие при послойной адсорбции полиэлектролитов и обработке ультразвуком получить стабильные нано- и микрочастицы с рН-чувствительными свойствами, зависящими от природы иммобилизованного белка и биополимеров, количества и последовательности слоев, условий формирования частиц. Для микрочастиц, сформированных с применением высокомолекулярных декстрансульфата и хитозана, показано рН-зависимое высвобождение белка и наличие мультифункциональных свойств (защитных, кальций связывающих, мукоадгезивных), способствующих повышению биодоступности белков при доставке через слизистые поверхности, в том числе пероральной доставке. Повышение биодоступности микрокапсулированного в мультислойные микрочастицы инсулина было подтверждено в опытах на здоровых животных и животных с диабетом в остром и хроническом экспериментах. В работе разработаны рекомендации по выбору и включению в мультислойные микрочастицы белковых ингибиторов протеаз с целью дополнительной защиты целевых белков от действия основных протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта (пепсина, трипсина, химотрипсина).

При сравнении иммобилизации белковых препаратов в полиэлектролитные микрокапсулы путем предварительных адсорбции и соосаждения в мезопористые микросферы ватерита или включения в готовые матриксные и полые микрокапсулы предложены подходы, обеспечивающие высокое содержание белков и максимальное сохранение удельной активности рН-чувствительных ферментов в мультислойных препаратах. Включение оксидоредуктазных биферментных систем (глюкозооксидаза/пероксидаза и глюкозооксидаза/каталаза) в готовые

матриксные мультислойные микрокапсулы, полученные на меламинаформальдегидных ядрах, свидетельствовало о перспективности подхода для создания иммобилизованных мультиферментных каталитических систем.

При сорбции гликопротеина муцина из желудка свиньи на поверхности мультислойных полиэлектролитных микрокапсул и наноструктурированных микросфер ватерита впервые оценены мукоадгезивные свойства препаратов. При соосаждении муцина при формировании ватерита впервые сформированы гибридные микросферы с биополимером, обладающие по сравнению с контрольными частицами 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. Варьирование концентрации муцина при формировании гибридных микросфер может использоваться в качестве регулятора перекристаллизации частиц в кальцит, включения и высвобождения положительно заряженных белков (апротинин) и также низкомолекулярных биологически активных соединений, что было продемонстрировано для антрациклинового антибиотика доксорубицина. Исследование биологических свойств гибридных микросфер с муцином в сравнении с контрольными микросферами ватерита выявило меньшее связывание белков плазмы крови, отсутствие повреждения мембран эритроцитов и большую способность стимулировать продукцию активных форм кислорода нейтрофилами *in vitro*. Совокупность данных по включению белковых препаратов и результатов анализа биосовместимости позволяет предположить возможность использования гибридных микросфер ватерита с муцином, даже без нанесения полиэлектролитных слоев, в качестве комплексных средств пролонгированной доставки биологически активных соединений.

Достоверность полученных Балабушевич Н.Г. результатов подтверждается использованием в работе современных физико-химических методов исследования, применением при обработке и интерпретации результатов измерений стандартных и принятых в мировой научной практике методик и теоретических положений.

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 статьей в изданиях, индексируемых в РИНЦ. 17 статей автора опубликованы в журналах первого квартиля, 12 статей в журналах второго квартиля.

Статьи по материалам диссертационной работы Балабушевич Н.Г. и её соавторов были многократно цитированы в публикациях, посвященных послойной адсорбции полиэлектролитов, что позволило ускорить создание мультислойных частиц с заранее заданными свойствами, перспективных для использования в химической энзимологии и биотехнологии, аналитической биохимии и в фармации для создания новых систем пролонгированной и направленной доставки белковых препаратов.

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.

Приведенные в диссертации результаты хорошо систематизированы, их интерпретация убедительна и логична. Однако при рассмотрении материалов диссертации возникли вопросы и замечания.

1) При изучении влияния присутствия белковых ингибиторов протеаз на протеолиз инсулина человека и рекомбинантных инсулинов в растворе и в микрочастицах в условиях сока поджелудочной железы, следовало бы указать критерии значимости для оценки достоверности полученных различий в результатах экспериментов.

2) В работе предложен принцип действия в тонком кишечнике человека новых разработанных мультислойных микрокапсул с целевым белком (инсулином) и белковым ингибитором протеаз, при этом не проведены исследования биологического действия таких комбинированных препаратов и сравнение их действия с мультислойными полиэлектролитными микрочастицами, содержащими только целевой белок (инсулин).

3) Почему при исследовании биологического действия мультислойных микрочастиц с инсулином *in vivo* на крысах со стрептозотоцин индуцированным диабетом в остром и хроническом экспериментах сравнивали исследуемые препараты с подкожно введенными препаратами инсулина, а не с другими его пероральными формами?

4) В работе предложено получение новых гибридных микросфер с муцином в качестве контейнеров для доставки лекарственных веществ и создания комплексных препаратов, содержащих одновременно белковые препараты, антибиотики или противомикробные вещества. Каков примерный механизм действия таких систем доставки, какие преимущества им обеспечит наличие муцина, и какие готовые лекарственные формы, автор считает можно получать на основе таких микросфер?

5) При исследовании цитотоксичности и биологической активности микросфер ватерита, почему не использовались наиболее распространенные методы оценки цитотоксичности *in vitro* на клетках (МТТ или ХТТ тесты)? Был ли контроль и определение критерия значимости при оценке

литического действия различных микросфер ватерита? Как связана биологическая активность микросфер ватерита с образованием активных форм кислорода нейтрофилами?

б) Излишне подробная методическая часть с описанием известных из литературы методик анализа активности ферментных препаратов.

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, доцент  
заведующий кафедрой  
технологии химико-фармацевтических и косметических средств  
факультета химико-фармацевтических технологий и биомедицинских  
препаратов Российского химико-технологического университета  
имени Д.И. Менделеева

Кусков Андрей Николаевич

Контактные данные:



тел.: 7 (495) 495-24-06, e-mail: kuskov.a.n@muctr.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:

03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 02.00.06 -  
высокомолекулярные соединения

Адрес места работы:

125047, Москва, Миусская площадь, д. 9

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Российский химико-технологический университет  
имени Д.И. Менделеева»

Подпись А.Н Кускова  заверяю