

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Мусина Егора Валиевича
на тему: «Изучение физико-химических свойств полиэлектролитных
микрокапсул и разработка технологии их разрушения для создания
микроконтейнеров» по специальности 1.5.6. Биотехнология**

Разработка новых эффективных микроконтейнеров для доставки самых различных веществ, в частности низкомолекулярных красителей, низкомолекулярных лекарств, белков (например, ферментов, антител или антигенов), а также других биомакромолекул (например, ДНК, РНК) является одним из перспективных направлений биомедицины и биотехнологии. Полиэлектролитные микрокапсулы (ПМК) занимают, несомненно, особое место в списке таких систем для инкапсулирования. Несмотря на тот факт, что такие микрокапсулы впервые были получены еще 25 лет назад, они не потеряли своей актуальности, а спектр их применения в самых различных областях биотехнологии и биомедицины непрерывно расширяется. Все больше и больше научных групп во всем мире получают, изучают и предлагают новые, иногда совсем неожиданные области их применения. Такой успех ПМК объясняется, безусловно, как универсальностью и простотой метода их получения, который получил в англоязычной литературе название “layer-by-layer technique”, так и возможностью широкого выбора полимеров для формирования полиэлектролитной оболочки капсул, не говоря уже о постоянно расширяющемся списке веществ, которые можно в них включать для решения той или иной конкретной задачи. Тем не менее, несмотря на широкий спектр применения ПМК в качестве универсальных микроконтейнеров, остаются неизученными некоторые важные физико-химические свойства и особенности структуры ПМК.

Цель данной работы заключалась в исследовании некоторых физико-химических свойств ПМК и разработке новой технологии их разрушения, которая связана с использованием инкапсулированных спор *B.subtilis*.

Таким образом, **актуальность** представленной работы несомненна.

Научная новизна данной работы заключается в обнаружении того факта, что увеличение ионной силы среды снижает стабильность ПМК из-за возрастания десорбции полимера из ПМК. Впервые показано, что повышение температуры среды приводило к повышению стабильности микрокапсул, сформированных на составном сферолите CaCO₃-белок, но не влияло на стабильность аналогичных капсул, полученных на CaCO₃ сферолите. Показано также отсутствие десорбции полиэлектролита при 5°C независимо от ионной силы среды. Установлено, что белок не высвобождается из ПМК в случае их формирования на составном сферолите CaCO₃-белок независимо от ионной силы раствора и температуры среды, в то время как из ПМК, сформированных на CaCO₃ сферолите и загруженных белком методом сорбции, наблюдали высвобождение белка при увеличении ионной силы раствора, при этом оно не зависело от температуры. Впервые обнаружено перемешивание полиэлектролитных слоев при формировании капсул, особенно для ПМК на CaCO₃ сферолите, что приводило к нарушению соответствия заряда поверхности ПМК заряду внешнего слоя полиэлектролита. Следует особо отметить разработку новой технологии с применением инкапсулированных спор *B.subtilis*, которую можно использовать для разрушения ПМК и высвобождения инкапсулированных веществ из микроконтейнеров. Таким образом, **научная новизна** представленной диссертации совершенно очевидна.

Научно-практическая значимость диссертации связана с тем, что полученные результаты можно использовать на практике при разработке системы доставки на основе микроконтейнеров. В частности можно предсказать скорость высвобождения из капсул конкретного вещества и десорбции полимера. Обнаруженный автором эффект перемешивания полиэлектролитных слоев ПМК важно принимать во внимание при оценке взаимодействия ПМК с клетками, а влияние ПМК на буферную ёмкость среды следует иметь ввиду при разработке рН чувствительных сенсоров на

основе ПМК. Разработанный автором метод разрушения ПМК с использованием спор *B.subtilis* для высвобождения загруженного в капсулы вещества можно предложить для создания новой формы лекарств. Таким образом, научно-практическая значимость диссертации также не вызывает сомнений.

Общая характеристика диссертационной работы

Работа выполнена на Кафедре синтетической биологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и в Лаборатории роста клеток и тканей ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

Диссертация имеет традиционную структуру и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, главы Результаты и их обсуждение, а также Заключение и Выводов. Работа изложена на 108 страницах, содержит 21 рисунок и 2 таблицы. Библиография включает 246 источников.

Глава Литературный обзор состоит из трех разделов :

3.1 Микроконтейнеры

В этом разделе подробно рассмотрены различные микроконтейнеры, которые применяются в биомедицине (подраздел 3.1), биотехнологии (подраздел 3.1) и прочих областях (подраздел 3.1).

3.2 Полимерные микроконтейнеры

В этот разделе автор рассматривает различные типы микроконтейнеров, в частности 1) ковалентно-сшитые полимерные капсулы; 2) капсулы, сформированные за счет электростатических взаимодействий; 3) капсулы, основанные на молекулярном узнавании (molecular recognition). Формирование последних происходит благодаря молекулярному узнаванию за счёт нековалентных взаимодействий типа «гость-хозяин». При этом молекула «хозяин» имеет участок избирательного связывания с молекулой - «гостем» и обе молекулы должны структурно и энергетически соответствовать друг другу.

3.3 Полиэлектrolитные микрокапсулы

В этом разделе автором подробно рассмотрены влияние ядра на структуру полиэлектролитных микрокапсул (подраздел 3.3.1); свойства полиэлектролитной оболочки (подраздел 3.3.2); влияние факторов среды на полиэлектролитные капсулы (подраздел 3.3.3); декапсуляция веществ из полиэлектролитных микрокапсул (подраздел 3.3.4).

Литобзор хорошо структурирован, написан грамотно и логично, дает достаточно полное представление о современном состоянии проблемы. Из 246 приведенных автором ссылок 26 источников (прибл. 10 % от общего количества) относятся к периоду 2018 -2023 гг.

В Главе 4 (Материалы и Методы) достаточно полно описаны реактивы и реагенты, а также все использованные в работе методы, в частности получение микросферолитов CaCO_3 ; получение составных микросферолитов методом копреципитации; приготовление полиэлектролитных микрокапсул; загрузка полиэлектролитных микрокапсул веществом методом сорбции; получение флуоресцентно меченых ПАА и БСА; определение содержания полиэлектролита в микрокапсулах; регистрация десорбции оболочки и выхода белка; определение заряда ПМК; культивирование бактериальных культур; измерение буферной ёмкости; регистрация разрушения капсул спорами.

Результаты и их обсуждение представлены в Главе 5. В этой Главе содержится 5 подглав. В целом, **Глава Результаты и их обсуждение** хорошо структурирована, логично написана и проиллюстрирована цветными схемами, рисунками и двумя таблицами. Все это позволяет получить представление о достаточно большом объеме проведенных экспериментов и тщательном анализе результатов. Таким образом, безусловной заслугой автора являются безупречная логика, аккуратность и последовательность в планировании и проведении экспериментов, а также тщательное обсуждение полученных результатов.

Степень достоверности полученных результатов. Исследование выполнено на высоком научном и методическом уровне с применением самых современных методов исследования. Диссертационная работа включает подробное описание использованных методик, для обработки экспериментальных данных использованы методы математической статистики.

Выводы диссертации сформулированы четко и логически вытекают из материалов проведенного исследования. Научные положения, выносимые на защиту, полностью отражают основные результаты диссертационного исследования.

Основные результаты диссертации опубликованы в 7 статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в наукометрических базах данных Web of Science и/или Scopus. В списке публикаций автора имеются 5 статей, опубликованных в достойных международных журналах : Nanomaterials (IF 5,076 WoS); две статьи в Polymers (IF 4, 967 WoS); Scientific Reports (IF 4, 379 WoS); две статьи в International Journal of Molecular Sciences (IF 5.923 WoS);

В целом как диссертационная работа, так и автореферат Мусина Е.В. написаны грамотно и проиллюстрированы достаточно большим количеством схем, фотографий, цветных рисунков и таблиц.

Из работы следует, что автором выполнен достаточно большой объем исследований с применением самых современных физико-химических методов.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

При прочтении диссертации возникло несколько вопросов, в частности следующие :

1. Полученные образцы капсул никак не охарактеризованы в плане их размеров (средний размер и распределение ПМК по размерам, индекс полидисперсности PDI). Так, в автореферате на рис. 13 приведены микрофотографии капсул и написано что “ капсулы представляли собой частицы диаметром 8 ± 1 мкм...” Это средний диаметр или размер одной

попавшей на микрофотографию капсулы? Микрофотография, на которой приведены 3 капсулы, не дает никакого представления ни о среднем диаметре, ни о том, насколько широким было распределение капсул по размерам (PDI). Вся эту информацию можно представить в виде гистограммы. На рис. 14 приведены еще 4-5 капсул, но уже с размерами 2–3 мкм (как пишет автор), в то время как размер разрушенных капсул, составлял 5–7 мкм. Сверху дана шкала 10 микрон, из чего становится совсем неочевидным указанный автором размер капсул 2-3 микрона.

Для определения точных размеров объектов с помощью оптического микроскопа используют объект-микрометр и окуляр-микрометр (с линейкой, имеющий известный размер одного деления). С помощью оптической микроскопии легко определить размеры 30-40 капсул и построить диаграмму распределения ПМК по размерам. Шкала должна быть расположена в нижнем правом углу, а не сверху микрофотографии.

2. Непонятно, каким образом автор оценил, что 60 % капсул разрушилось после прорастания спор *B. subtilis*.

3. Не совсем понятен выбор материалов для ПМК. Капсулы ПСС/ПАА являются самой исторически первой и наиболее изученной системой. Эти полиэлектролиты не биodeградируют, и, следовательно, вряд ли могут быть использованы при разработке систем доставки лекарств. В литературе уже описано много других более пригодных для этой цели ПМК на основе природных полисахаридов (например, сульфата хитозана), полипептидов (полилизин, полиаргинин и др.) и других биodeградируемых полиэлектролитов.

4. Мне не хватило сводной таблицы всех образцов, полученных и использованных в работе, с их минимальной характеристикой, которая бы включала, например, обозначение образца, количество слоев, способ получения (на CaCO₃ сферолите или составном сферолите CaCO₃-белок), средний размер ПМК, дзета-потенциал и т.д.

5. В работе встречаются ошибки, опечатки, неудачные выражения.

Так, пропущен предлог “ на” в Оглавлении диссертации и заголовках на стр. 64 (5.2.1) и 65 (5.2.2). Автор потерял часть сокращений, которые не вошли в лист сокращений (ПИПАМ, ПВС и др.). Пропущено слово “раствор” практически везде в тексте, где речь идет о растворах NaCl с различными концентрациями (0, 2 М NaCl, 1М NaCl и т.д.). Это допустимо в подписи кривых на рисунках, но не в тексте диссертации и автореферата. Ошибка в слове “аргинин” (см. Список сокращений в диссертации, стр. 12). Непонятно, почему список сокращений приведен только на 12 стр. Его место сразу после Оглавления. Термин “выращивание” (о бактериальных клетках, см. Материалы и Методы в диссертации, стр.55) не совсем удачный. Лучше заменить на “культивирование”. Авторы не удалось убрать все точки из заголовков (см диссертацию Материалы и Методы, стр.52, 53).

6. Список публикаций очень большой (246 источников). При этом количество статей за последние 5 лет (2017-2023) составляет всего 10 % (26 статей) в этом списке. Пожелание автору на будущее : не брать так много старых статей, чтобы увеличить процент новых статей в списке публикаций. Иначе складывается искаженное впечатление как об актуальности работы, так и о том, насколько автор внимательно смотрит новую литературу по теме.

Все указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования, а некоторые из них носят характер пожелания.

Диссертация Мусина Е.В. отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.6. Биотехнология (по биологическим 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 требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на

соискание учёной степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Мусин Е.В. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6.Биотехнология.

Официальный оппонент:
доктор химических наук,
главный научный сотрудник,
лаборатория биомедицинских материалов
отдела биоматериалов и бионанотехнологий
ФГБНУ Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
МАРКВИЧЕВА Елена Арнольдовна

11.10.2023

Контактные данные:
тел.: 7(495) 336 06 00, e-mail: lemarkv@
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
03.00.04 - Биохимия

Адрес места работы:
117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
ФГБНУ Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
Лаборатория биомедицинских материалов
Тел.: 7 (495) 336 06 00; e-mail: lemark@ibch.ru

Подпись Марквичевой Е.А. удостоверяю
Ученый секретарь ФГБУН ИБХ РАН
доктор физ-мат наук

Олейников В.А.