

**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
микрочестейнеров» по специальности 1.5.6. Биотехнология**

Актуальность: Первые продукты, содержащие инкапсулированные материалы, появились во второй половине XX века в фармацевтической промышленности. Целью их разработки было контролируемое высвобождение лекарств для доставки в пораженные органы. Инкапсуляция может положительно повлиять на доступность и сохранение активности целевых химических соединений, поскольку данный метод обеспечивает защиту активного компонента мембраной, и направленную доставку ядра материала в определенную часть организма хозяина и его постепенное высвобождение. К настоящему времени технология микрокапсулирования широко используется в фармацевтической промышленности для контролируемого высвобождения лекарственных средств, повышения стабильности и маскировки вкуса лекарственных препаратов. Сущность микрокапсулирования заключается в «упаковке» требуемого вещества внутри стабильной оболочки – контейнера, способного обеспечить защиту инкапсулированного объекта от воздействия агрессивной внешней среды, его доставку и контролируемое высвобождение. К микрочестейнерам относятся липосомы (Sercombe et al., 2015), фуллерены (Zakharian et al., 2005), микрокапсулы из нейлона (Chang, 1976), человеческого альбумина (Longo, Goldberg, 1985), фармакоциты на основе клеток человека и животных (Бегдуллаев и др., 2008; Цой и др., 2012). Одними из перспективных многофункциональных микрочестейнеров являются полиэлектролитные микрокапсулы.

Научная новизна: Установлено, что увеличение ионной силы среды снижает стабильность полиэлектролитных микрокапсул за счёт увеличения десорбции полимера из их состава. Повышение температуры среды увеличивает стабильность микрокапсул, приготовленных на составном

сферолите CaCO_3 -белок, но не влияет на стабильность капсул, приготовленных на CaCO_3 сферолите. Показано отсутствие десорбции полиэлектролита при 5°C независимо от ионной силы среды. Установлено, что белок не выходит из микрокапсул, приготовленных на составном сферолите CaCO_3 -белок, независимо ионной силы раствора и температуры среды. В случае капсул, приготовленных на CaCO_3 сферолите и загруженных белком методом сорбции, высвобождение белка происходит с возрастанием ионной силы раствора и не зависит от температуры. Обнаружено перемешивание полиэлектролитных слоев в ходе приготовления ПМК, которое особенно выражено у микрокапсул, изготовленных на CaCO_3 сферолите. В результате этого перемешивания нарушается соответствие заряда поверхности микрокапсул заряду внешнего слоя полиэлектролита. Выявлена буферная ёмкость микрокапсул, обусловленная количеством не связанных групп ПАА, показана её зависимость от ряда физико-химических факторов. Разработана новая технология разрушения полиэлектролитных микрокапсул, с применением инкапсулированных бактериальных спор на основе *Bacillus subtilis* штамм ВКМ В-501Т. Технология может быть применена для высвобождения инкапсулированных веществ из микроконтейнеров на основе ПМК.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты расширяют знания о свойствах и организации полиэлектролитных слоев микрокапсул. Они могут быть использованы для правильного подбора типа микрокапсул при создании микроконтейнеров различного назначения, предсказания скорости высвобождения из них вещества и десорбции полимера в различных условиях. Данные о перемешивании полиэлектролитных слоев ПМК и зависимости их поверхностного заряда от внешнего слоя, необходимо учитывать при закреплении микрокапсул и предсказания их взаимодействия с клетками. Данные о влиянии микрокапсул на буферную емкость среды важно учитывать при создании на основе микрокапсул рН чувствительных сенсоров, интерпретации результатов их работы и определения их чувствительности. Эти же данные могут быть использованы при описании

объекта и понимания интерполиэлектролитного взаимодействия внутри микрокапсул. Новая технология разрушения ПМК и декапсуляции веществ, на основе бактериальных спор *B.subtilis*, может стать основой для создания новой формы лекарственного средства.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.

Структура диссертационной работы Мусина Е.В. изложена на 108 страницах, содержит 21 рисунок и 2 таблицы. Список цитируемой литературы включает 246 источников. По теме диссертации опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в наукометрических базах данных Web of Science и/или Scopus.

В главе 3. представлен обзор литературы, где автором детально рассмотрены современные подходы к созданию и применению микроконтейнеров. Охарактеризованы различные типы микроконтейнеров и актуальные исследования инкапсуляции в них различных веществ. Подробно описаны различные типы полиэлектролитных микрокапсул, их химическое строение в зависимости от выбранного носителя при приготовлении. Отдельное внимание посвящено аспектам практического применения микрокапсул, в частности влиянию на микрокапсулы факторов среды и способам их контролируемого разрушения для высвобождения веществ. Детально рассматриваются вопросы применения микрокапсул в различных отраслях биотехнологии: для адресной доставки лекарств, пестицидов защиты растений, в экологической биотехнологии.

Глава 4 представляет собой методическую часть, в которой содержится исчерпывающая информация по объектам и материалам исследования, а также всех используемых автором в диссертационной работе методик, включающих классические и современные химические методы, а также блок микробиологических и молекулярных исследований для исследования десорбции МПК.

Глава 5 разделена диссертантом на ряд подглав (5.1 – 5.3), согласно поставленным ранее задачам, и прекрасно иллюстрирована - во всех

подглавах в качестве подтверждения имеется подробный материал, представленный в виде графиков и таблиц с результатами, полученными соискателем. **Подглава 5.1.** включает результаты исследований микрокапсул 2-х типов: полученных на CaCO_3 сферолите и на составном сферолите CaCO_3 -белок. Соискателем сделан вывод о том, что, влияние ионов на десорбцию полиэлектролитов связано не с конкурентным связыванием сульфогрупп соли с аминогруппами полиэлектролита, а с электростатической природой взаимодействия. Полученные Мусиным Е.В. результаты свидетельствуют о высокой стабильности полиэлектролитных микрокапсул, полученных на составном сферолите CaCO_3 -белок, при их хранении в воде и растворах слабой ионной силы. Полиэлектролитные микрокапсулы, полученные на сферолите CaCO_3 , стабильны при инкубации в воде, но менее устойчивы к влиянию ионной силы раствора. Повышение температуры среды на стабильность таких микрокапсул влияния не оказывает.

Подглава 5.2 посвящена оценке динамики высвобождения инкапсулированного белка из микрокапсул, полученных составном сферолите CaCO_3 -белок и на CaCO_3 сферолите, при различных условиях. Автором установлено, что увеличение ионной силы раствора, приводит не только к уменьшению полиэлектролит-полиэлектролитных взаимодействий (что подтверждается данными по увеличению десорбции), но и к экранированию ионами молекул белка от полиэлектролита. Полиэлектролитные микрокапсулы, полученные на сферолите CaCO_3 , могут удерживать белок при хранении в воде, но высвобождают его при увеличении ионной силы раствора, независимо от температуры. Это свойство позволяет рассматривать их в качестве перспективной системы для пролонгированного высвобождения инкапсулированного вещества. Такая система может быть перспективна в фармакодинамике, когда требуется длительное поддержание концентрации лекарственного препарата в организме пациента. **Подглава 5.3** содержит результаты изучения организации полиэлектролитных слоев микрокапсул. Соискателем показано, что при наличии внутри капсулы CaCO_3 ядра, полиэлектролитные слои упорядочены и поверхностный заряд микрокапсулы соответствует заряду

внешнего полиэлектролитного слоя. При растворении CaCO_3 ядра происходит перемешивание полиэлектролитных слоёв, и эта зависимость исчезает. В подглаве 5.4 изучена буферная ёмкость микрокапсул. Автором выдвинута гипотеза о том, что за буферные свойства ПМК ответственны свободные группы ПАА. При увеличении ионной силы раствора происходит увеличение буферной ёмкости, что связано с экранированием полиэлектролитов ионами соли и, как следствие, разрыхлением микрокапсул и увеличением количества свободных групп ПАА. При предварительном прогреве микрокапсул происходит уменьшение количества свободных групп ПАА и снижение буферной ёмкости ПМК, однако, добавление соли восстанавливает буферную ёмкость системы. В подглаве 5.5 представлена технологическая схема приготовления на основе МПК с бактериальной системой декапсуляции с использованием инкапсулированных спор пробиотического штамма *B.subtilis* ВКМ В-501Т. В ходе работы показано, что система активируется при попадании ПМК в условия благоприятные для роста бактерий и в течение 24 часов капсулы разрушаются с высвобождением инкапсулированного вещества.

Автором в диссертационной работе представлено «**Заключение**», в котором обстоятельно систематизированы результаты диссертационной работы. **Выводы** сформулированы обосновано, и полностью отражают представленный экспериментальный материал. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Несмотря на значимый экспериментальный материал, целостность и масштабность проведенного исследования к работе есть ряд замечаний и вопросов:

1. Из представленных в работе соискателем данных не понятно, по каким параметрам был выбран штамм *B.subtilis* ВКМ В-501Т, использующийся в работе для системы разрушения ПМК. Отсутствует характеристика культуры в Главе 4 (методика). Проводился ли скрининг с другими культурами, откуда именно известно про его антимикробные свойства и о том, что штамм пробиотический? В коллекции ВКМ он числится как типовой, и

вышеперечисленные сведения, указанные в диссертации, на сайте каталога отсутствуют (<https://vkm.ru/strains.php?vkm=B-501>). В этой же коллекции депонированы как пробиотические ряд культур этого вида, например две из них - *Bacillus subtilis* ВКМ В-2250, *Bacillus subtilis* ВКМ В-2287 входят в состав пробиотика «Субтилис». Соискателю следовало бы привести более подробные пояснения выбора данной культуры.

2. Из приведенной технологической схемы неясно, будет ли стадия подготовки споровой суспензии бацилл проводиться в разных помещениях или в одном? Как будет осуществляться предварительный этап культивирования бактерий? Что из себя представляет стадия Т. 3.4 «микробиологический контроль включения» инкапсулированного вещества и чем она отличается от «микроскопического контроля»?

3. Из приведенных результатов работы и технологической схемы неясно, какие суммарные потери основного продукта прогнозируются на всех стадиях производства, предложенных в схеме?

4. Диссертация содержит много неточностей. Например, на стр.80 автор с отсылкой на статьи ((Harwood, 1992; Tam et al., 2006) пишет, что *B.subtilis* входят в состав кишечной микрофлоры человека и по этой причине способны разрушать МПК; неправильно приведены видовые названия микроорганизмов стр.16, 18 и ряд других. Текст рукописи изобилует опечатками.

Вышесказанное не уменьшает научной ценности работы, 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

ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

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

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент,
заместитель директора по научной работе,
заведующая лабораторией таксономического изучения
и коллекции культур микроорганизмов
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»
САДЫКОВА Вера Сергеевна

13.10.2023

Контактные данные:

Тел. +7(499) 255 20 13 E-mail: sadykova

Специальность, по которой официальным оппонентом
защита диссертация: 03.02.12 – Микология; 03.01.06 – Биотехнология (в
том числе бионанотехнологии)

Адрес места работы:

119021, Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых
антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», лаборатория таксономического изучения и
коллекции культур микроорганизмов

Тел. +7(499) 255 20 13 E-mail: sadykova

Подпись Садыковой В.С. удостоверяю.

Ученый секретарь ФГБНУ «НИИНА»,

кандидат химических наук

О.В. Кисиль