

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»

Работа Балабушевич Надежды Георгиевны посвящена разработке полимерных микрокапсул для включения белков. Развитие методов белковой инженерии и биотехнологии привело в последние 20 лет к созданию большого количества белковых препаратов, представляющих интерес в качестве потенциальных субстанций для фармпрепаратов. Их более широкое и безопасное внедрение в фармакологическую практику ограничивается низкой стабильностью белков в плазме крови и необходимостью защищать белковые молекулы от ретикулоэндотелиальной системы организма. Еще более остро аналогичная проблема стоит для создания препаратов, предназначенных для перорального введения. В этом случае вводимый белок испытывает действие пищеварительных ферментов тонкого кишечника, которые практически полностью разрушают любой белок.

Для решения этой проблемы используются различные способы включения белков в надмолекулярные конструкции на основе полимеров, призванных экранировать белок от клеток ретикулоэндотелиальной системы. При этом полимерная оболочка должна препятствовать распознаванию белков молекулами иммунной системы и затруднять его протеолитическую деградацию под действием протеаз. Дополнительным фактором, который обуславливает интерес к полимерным капсулам, наногелям или мицеллам, является способность полимеров к изменению конформации при изменении внешних условий, таких как рН или температура.

В рецензируемой работе для получения полимерных нанокапсул используется подход, основанный на послойной адсорбции противоположно

заряженных полиэлектролитов на заряженной матрице. Данный подход развивается начиная с 1998 года, причем первая статья данной научной группы по этой тематике была опубликована лишь 3 года спустя, в 2001 году. Таким образом, можно сказать, что Надежда Георгиевна вместе со своим научным руководителем, Натальей Ивановной Ларионовой, стояли у истоков этого направления. Существенно, включение именно функционально активных белков в полиэлектролитные микрокапсулы впервые осуществлено именно этой научной группой. Это свидетельствует о несомненной актуальности результатов, представленных в диссертационной работе Надежды Георгиевны.

В работе предложен широчайший набор способов формирования белок-содержащих полимерных капсул на основе полиэлектролитных слоев. В качестве матриц для формирования послойных покрытий использованы частицы высоленного белка, нерастворимые полиэлектролитные комплексы белка, микрочастицы ватерита или меламин-формальдегидные микрочастицы. В качестве полианионов использованы полимеры биodeградируемых декстрансульфата, муцина и хитозансульфата, проявляющего свойства полиамфолита, а также альгината натрия и полистиролсульфоната. В качестве поликатионов использовались протамин, хитозан и полиаллиламин. Пара полистиролсульфонат-полиаллиламин была использована в качестве модельной пары полиэлектролитов, образующих прочные послойные покрытия, а основные результаты, представленные в работе, были получены на биосовместимых полиэлектролитах полисахаридной или белковой природы. Плотность заряда на таких полиэлектролитах заметно меньше плотности заряда на большинстве синтетических полиэлектролитов, что отражается на чувствительности послойных покрытий к внешним условиям. В то же время, выбор объектов соответствует поставленным в работе фармакологическим целям.

Работа Надежды Георгиевны построена традиционным образом. Она состоит из введения, обзора литературы, методической части и главы

результатов и обсуждения. Обзор литературы написан подробно и содержит 394 ссылки на оригинальные статьи. Обзор литературы состоит из 4 глав, посвященных закономерностям послойной адсорбции полиэлектролитов, свойствам ватерита, свойствам основного компонента слизи муцина и применению белок-содержащих многослойных частиц. Обзор литературы содержит всю информацию, необходимую для адекватной оценки работы.

Методическая часть диссертационной работы написана исключительно подробно. В работе использованы как современные физические методы, такие как ИК- и КР-спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма, динамическое светорассеяние, сканирующая электронная микроскопия, лазерная конфокальная микроскопия, рентгено-фазовый анализ и др., так и хорошо зарекомендовавшие себя классические биохимические методы работы с углеводами, такие как фуксин-сернистый метод определения диолов и фенол-серный метод определения восстанавливающих углеводов. Большое внимание в работе уделено методам определения объема пор и площади поверхности с помощью адсорбции азота. Используемые в работе методы не оставляют сомнений в достоверности полученных результатов и сделанных в работе выводов.

В первой части результатов и обсуждения автор рассматривает закономерности получения полиэлектролитных микрокапсул на основе белок-содержащих матриц. В данном разделе были рассмотрены два типа матриц: частицы высолённого белка и частицы нерастворимых белок-полиэлектролитных нестехиометрических комплексов. При этом было обнаружено, что формирование послойных покрытий в слабокислой среде, когда использованные поликатионы полностью заряжены, обеспечивает высокую загрузку белка в микрокапсулах, а повышение рН среды до 7-8 способствует высвобождению белков из микрокапсул. При этом снижение рН белка понижает эффективность его включения в микрокапсулы. Высвобождение белков из микрокапсул в нейтральной среде затрудняется с увеличением их молекулярной массы. Значение изоэлектрической точки белка

также влияет на скорость его высвобождения из состава микрокапсул, однако в значительно меньшей степени, чем молекулярная масса. Значительная часть данного раздела посвящена созданию микрокапсул, нагруженных инсулином или его смесью с белковыми ингибиторами протеаз. Показано, что инсулин может быть помещен во внутреннюю часть таких капсул либо через высаливание белка с образованием микрочастиц белка с последующим послойным покрытием полиэлектролитами, либо через образование нерастворимых полиэлектролитных комплексов. При этом одновременно с инсулином в состав микрокапсул могут быть включены ингибиторы протеаз, использование которых может предотвратить расщепление пептидного гормона в желудочно-кишечном тракте.

Блестящим завершением данного раздела является описание экспериментов по тестированию микрокапсул, наполненных инсулином, в качестве пероральной лекарственной формы. Тестирование проводили на здоровых кроликах и крысах с экспериментальным диабетом, вызванным введением стрептозоцина. Оказалось, что инсулин, вводимый перорально в полиэлектролитных капсулах, вызывал гипогликемический эффект сравнимый с инсулином, вводимым подкожно, что свидетельствовало о сохранении функциональной активности гормона при образовании полиэлектролитных комплексов.

Вторая глава раздела «Результаты и обсуждение» посвящена исследованию закономерностей включения белков в микрокапсулы на основе матриц, растворимых в кислой среде – меламина-формальдегидных частиц или частиц ватерита. В такие капсулы белок включали двумя способами: путем адсорбции белка на исходных частицах до формирования первого полиэлектролитного слоя, либо, добавляя белок к готовым полым капсулам после растворения кислотолабильного ядра. В результате кропотливой и очень тщательной работы автором было показано, что в первом случае белок наполняет внутреннюю полость капсул, а во втором – локализуется только во внешней полиэлектролитной оболочке. При этом наиболее эффективное

включение белка в уже готовые матриксные микрокапсулы наблюдается при рН вблизи изоэлектрической точки. Автору удалось показать, что наибольшее количество белка включается в микрокапсулы ватерита при использовании предварительного соосаждения в микросферы ватерита, а максимальное сохранение удельной активности иммобилизованных ферментов - при загрузке в готовые мультислойные частицы после растворения карбонатной матрицы. Очень красивые результаты получены при включении биферментной системы глюкозооксидаза-пероксидаза, способной служить сенсором на глюкозу.

Наконец, третья глава раздела «Результаты и обсуждение» посвящена применению природного полианиона муцина в качестве компонента мультислойных покрытий для микрокапсулирования белков. В этом разделе автору удалось впервые продемонстрировать мукоадгезивные свойства ватерита и возможность использования муцина для получения полиэлектролитных послойных покрытий. При этом добавление муцина к реакционной смеси при получении ватерита приводит к увеличению отрицательного заряда частиц и их эффективной площади, суммарной пористости и уменьшению их тенденции к перекристаллизации в кальцит. Исследование взаимодействия муцин-содержащих частиц с цельной кровью и плазмой выявило отсутствие гемолитической активности частиц и способность к адсорбции белков плазмы. Данные частицы обнаружили существенно более высокую способность стимулировать образование активных форм кислорода нейтрофилами по сравнению с контрольными микросферами ватерита.

Следует отметить, что выводы работы ясно обоснованы всем представленным в работе экспериментальным материалом и четко сформулированы. Учитывая, что Балабушевич Н.Г. стояла у истоков развития методов включения белков в полиэлектролитные послойные микрокапсулы, большинство полученных результатов являются абсолютно пионерскими. В частности, включение белков в микрокапсулы путем покрытия

полиэлектролитами частиц высоленного белка и нестехиометрических полиэлектролитных комплексов предложен впервые в данной лаборатории. В данной работе впервые подобран ряд биосовместимых полиэлектролитов, пригодных для создания полиэлектролитных мультислойных покрытий. В частности, впервые предложено использовать муцин в качестве анионного компонента послойных покрытий для получения биосовместимых многослойных микрокапсул. В работах Балабушевич Н.Г. впервые продемонстрирована рН-чувствительность получаемых мультислойных микрокапсул и подробно исследованы закономерности высвобождения из них различных белков. Наконец, в работах Балабушевич впервые исследована локализация белков в преформированных полых нанокapsулах.

В целом, диссертация Балабушевич Н.Г. производит очень приятное впечатление, однако при ее прочтении возникают некоторые вопросы.

1. На странице 88 диссертации проводится количественная оценка соотношения макромолекул декстрансульфата и инсулина в комплексе. Хотелось бы прояснить смысл этих расчётов, учитывая широкое молекулярно-массовое распределение декстрана обычно индекс полидисперсности коммерчески доступных полимеров (соотношение средневесовой и среднечисловой молекулярных масс) составляет величину около 2, что соответствует разбросу молекулярных масс почти в 100 раз.

2. Можно ли утверждать, что хитозансульфат образует мультислойные структуры, или это просто комплексы? Судя по рН-профилю высвобождения инсулина на рис. 3.9 поведение конструкций с сульфатом хитозана указывает именно на то, что в этом случае образуются поликомплексы с полиамфолитом.

3. В работе в основном получают довольно крупные микрокапсулы по размеру сопоставимые с эритроцитами. Поскольку ферменты в микрокапсулах сорбируются на поверхности, очевидно, что ядро не нужно вообще. А значит, не нужен и большой размер, который скорее мешает захвату капсул клетками и может вызывать эмболию. Ядро нужно только для того,

чтобы сформировать первый слой. Почему тогда не используются частицы размером порядка десятков нанометров? Ведь это было бы более перспективно с точки зрения доставки лекарств путем эндоцитоза.

4. В разделе 3.3.3 исследовано комплексообразование доксорубина с муцин-содержащими микросферами ватерита. Из текста не совсем понятно, содержал ли буфер для исследования комплексообразования доксорубина физиологическую ионную силу. Известно, что ионные комплексы доксорубина с полианионами легко распадаются при физиологической концентрации соли, если в их образовании, помимо электростатических сил, не принимают участие гидрофобные взаимодействия или водородные связи.

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

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 них 39 статей в рецензируемых научных 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 рецензируемых научных изданиях, индексируемых в РИНЦ.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует 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,

ведущий научный сотрудник,

заведующий лабораторией функциональных полимеров и полимерных

материалов кафедры высокомолекулярных соединений

химического факультета

Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Мелик-Нубаров Николай Сергеевич

18 января 2023 г.

Контактные данные:

тел.: 7 (495)939-31-27, e-mail: melik.nubarov@genebee.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация:

02.00.06 - высокомолекулярные соединения

Адрес места работы:

119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 3

ФГБУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.

Ломоносова», химический факультет