



**МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА
(МГУ)**

Ленинские горы д.1, Москва, 119991.
Телефон: (495) 939-10-00, 203-65-65
Факс: (495) 939-01-26

02.09.2016 № 1024-16/013-03

На № _____

УТВЕРЖДАЮ

Проректор
федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования
«Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»
- начальник Управления научной политики и
организации научных исследований,
профессор А.А.Федянин



«02» сентября 2016 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Антипиной Марии Николаевны на тему «Полимерные мультислойные капсулы для обеспечения оптимального биоэффекта лекарственных препаратов и активных веществ», представленную в диссертационный совет Д 212.243.05 при ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

Актуальность темы исследования. Главным преимуществом наноструктурированных систем для доставки биологически активных веществ в организме является более высокая эффективность медикаментозного лечения заболеваний и выраженное уменьшение, а часто и полное нивелирование побочных эффектов от применения лекарств. Инкапсулирование также становится все более востребованным в «умных» косметических средствах и продуктах питания с омолаживающим и/или лечебным эффектом, где защитные оболочки помогают предотвратить

деградацию активных веществ, увеличить их биодоступность за счёт целевой доставки в клетки-мишени и обеспечить оптимальную терапевтическую концентрацию.

Одним из наиболее важных предметов современных исследований молекулярной биофизики является детальное изучение механизмов процессов самоорганизации макромолекул в живых системах. Результатом этих исследований стало создание нескольких подклассов нанотранспортных систем; причём некоторые из них уже нашли коммерческое применение в инкапсулировании и целевой доставке биологически активных препаратов в био-системах или находятся в стадии активной разработки. Первоначальный теоретический успех и последующая коммерциализация лекарств, инкапсулированных с помощью липосом и полимерных мицелл, постепенно вскрыли и ряд существенных недостатков этих «нанотранспортеров», главным из которых является отсутствие универсальности, т.е. строгая специализация капсул определенного типа для инкапсулирования веществ с фиксированным набором физико-химических свойств. При этом трансляция известных нанотранспортных систем на другие классы активных молекул зачастую невозможна без ряда структурных исследований или синтеза новых соединений, что удорожает и удлиняет процесс разработки транспортеров, а также ограничивает пределы их безопасного применения для биологических систем.

Создание универсальной капсулы-нанотранспортера для биологических систем предполагает использование биосовместимых и биodeградируемых материалов, не обладающих токсичностью и не способных индуцировать аллергические реакции, но в то же время обеспечивающих достаточную структурную стабильность капсулы. Помимо этого, важным свойством, отличающим именно универсальную транспортную систему, является возможность контролируемо изменять физические параметры капсулы, такие как диаметр, полезный объём (что

определяет пределы достижения терапевтического эффекта доставляемых капсулой лекарств и эффективность их доставки к месту применения) и проницаемость. Наконец, универсальной капсуле-транспортеру необходимы простые в их практической реализации, но эффективные способы контроля попадания капсулы в клетки-мишени и направленной деградации, ведущие к наиболее полному высвобождению полезного груза. Разработка универсальных нанотранспортёров для живых организмов невозможна без детальных исследований механизмов действия активных веществ, оптимальных способов их введения и фармакокинетики. Таким образом, инкапсулирование оказывается сложной и комплексной задачей, требующей значительных теоретических и прикладных исследований фундаментального плана на стыке биологии, физики, химии и клинической медицины.

В данной диссертационной работе используется перспективная платформа для получения универсальных капсульных систем, способных транспортировать все основные классы биологически-активных веществ – полимерные мультислойные капсулы, формируемые с помощью послойной самоорганизации макромолекул на поверхности темплата. Несмотря на явные достоинства данного типа «нанотранспортеров», такие как возможности инкапсулировать гидрофильные и гидрофобные вещества, варьировать размер и состав оболочки, пассивировать её поверхность, контролировать локализацию капсул и высвобождение активных молекул различными физическими и физико-химическими воздействиями, ряд имеющихся ограничений, связанных в основном с особенностями методов инкапсулирования, токсичностью и дороговизной поликатионов (необходимых компонентов капсул, собираемых за счёт электростатики), сравнительно большим размером капсул (более 1 мкм) и их высокой проницаемостью для низкомолекулярных веществ, не позволил к настоящему времени в полной мере раскрыть потенциал таких полимерных

мультислойных систем для лечения заболеваний, а также применять их в косметике и продуктах пищевой промышленности.

В связи с вышесказанным особую актуальность имеют исследования, нацеленные на усовершенствование методов инкапсулирования, миниатюризации капсул, расширения набора природных компонентов, применяемых для их сборки, а также изучения механизмов и способов контроля проницаемости для разных классов веществ, которые решаются в данной диссертационной работе. Успешные разработки полимерных мультислойных капсул универсального плана для применений на уровне организма человека, представленные соискателем, имеют большое фундаментальное и прикладное значение и представляют особую важность для расширения спектра новых медикаментов лекарственного рынка России и инноваций в сфере косметической продукции и функциональных продуктов питания.

Обоснованность и достоверность полученных результатов.

Представленная диссертация состоит из семи глав, введения, заключения, списка использованной литературы и приложений, которые в полном объеме раскрывают цель и задачи исследования и адекватно отражены в сделанных соискателем выводах. Содержание и структура диссертации находятся в логическом единстве и соответствуют поставленной цели работы. Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается тщательным анализом результатов современных исследований зарубежной и особенно отечественной школы микроинкапсулирования (группы Г. Сухорукова, Ю. Львова, А. Скиртача, С. Сухишвили и др.), обобщенных соискателем в обзоре литературы.

Работа обоснованно использует современные теоретические и эмпирические аспекты молекулярной биофизики и соответствующие им аналитические данные по самоорганизации биологических макромолекул. В диссертации широко используются накопленные к настоящему времени

знания о способах получения замкнутых наноструктурированных мультислоёв с применением различных типов межмолекулярных взаимодействий, и о механизмах контроля их основных физических параметров: размера, толщины и проницаемости. Физические основы теории фазовых превращений вещества и классической теории нуклеации и начальных стадий роста кристаллов, а также теории переконденсации послужили базой для получения наноразмерных кристаллов фатерита, наиболее пригодных темплатов для формирования биodeградируемых капсул. Функционирование циклов с положительной обратной связью по воспроизводству токсичных продуктов перекисного окисления липидов биологических мембран, изучаемое в разделе биофизики – биофизика мембранных патологий – грамотно применено соискателем для выявления основного прооксиданта *in vitro* и разработки экспериментального решения, с высокой эффективностью позволившего предотвратить процесс деградации инкапсулированного масла.

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием в ходе выполнения исследований сертифицированного оборудования и стандартизованных наборов реагентов для получения образцов и аналитических данных; воспроизводимостью экспериментальных данных в пределах, установленных погрешностью измерений; опубликованием всех экспериментальных результатов, вошедших в работу, в авторитетных научных изданиях на основании положительных отзывов рецензентов, являющихся признанными экспертами в соответствующих областях науки. Основные результаты, полученные автором в диссертации, опубликованы в 20 статьях в журналах, одобренных ВАК в качестве рецензируемых научных журналов, 1 главе в монографии и 3 международных патентных заявках.

Автореферат соответствует основным положениям диссертации.

Основные результаты исследования и их новизна. Основными элементами научной новизны, содержащимися в диссертационной работе, являются следующие результаты:

1. Соискатель разработал так называемый метод инкапсулирования «молекулярных коктейлей», который предлагает принципиально новый технологический подход к доставке многокомпонентных капсул в клеточные структуры. Метод особенно пригоден для доставки биологически активных веществ, чувствительных к изменению физико-химических параметров окружающей среды. Метод создаёт условия, в которых в системе совместно с биологически активным веществом присутствуют «вещества-протекторы», что обеспечивает стабильность структуры активного вещества и его биологических свойств как в процессе инкапсулирования, так и на этапе транспортировки к биологическим мишеням. С помощью предложенного метода впервые была осуществлена трансфекция клеток биосовместимыми полимерными мультислойными капсулами, содержащими молекулы матричной РНК.

Разработанный метод инкапсулирования был также применён соискателем для доставки основного фактора роста фибробластов (FGF2) посредством полимерных мультислоёв. В результате использования капсул, загруженных коктейлем, пролиферация клеток линии L929 увеличилась на 10 – 30% по сравнению с доставкой такого же количества белка в свободной форме. Измерения концентрации FGF2 в присутствии клеток и математический анализ данных показали, что при доставке белка капсулами его потребление клетками увеличивалось в 5 раз по сравнению с потреблением клетками свободного белка, что убедительно демонстрирует эффективность разработки и возможность снизить общее количество белка для достижения существенного терапевтического эффекта.

2. Соискателем разработаны капсулы с защитной функцией, которые активно реагируют с химическими повреждающими факторами

дисперсионной среды, тем самым предотвращая их негативное взаимодействие с транспортируемыми биологически-активными веществами. Практическим результатом разработки метода стал наблюдаемый впервые эффект полного подавления процесса перекисного окисления липидов инкапсулированного льняного масла при многодневном хранении при 37 °С в темноте, вызываемое установленным соискателем фактором – Fe²⁺. Для капсульной системы впервые показано, что превентивный антиоксидант (таниновая кислота), локализованный на границе раздела фаз, оказывается более эффективным, чем антиоксидант, разрывающий радикальную цепь, но помещённый непосредственно в масляную фазу (витамин Е). Математический расчёт на основе экспериментальных данных позволил установить, что защита, обеспечиваемая капсулами, эффективна, если стехиометрическое соотношение антиоксидант/прооксидант составляет 1:1.

3. Автором диссертационной работы исследован механизм высвобождения белковых молекул из мультислойных капсул, собранных посредством самоорганизации чередующихся полиэлектролитных слоёв противоположного заряда. Установлен характер взаимодействия капсулированного вещества с полимерами капсулы, суть которого составляет адсорбция высвобождающихся макромолекул полимерной сеткой оболочки и её «закупоривания» за счёт наличия нескомпенсированных электрических зарядов внутри полимерной сетки, которое в дальнейшем сдерживает выравнивание концентрации макромолекул снаружи и внутри капсулы. Показано, что способ загрузки и толщина оболочки капсулы служат факторами, регулирующими скорость высвобождения макромолекул, причём при определённых условиях возможно установление режима равномерного высвобождения содержимого капсулы (профиль скорости высвобождения имеет нулевой порядок).

4. Соискателем разработаны новые мультислойные капсулы на основе сывороточного белка и полифенола, которые собираются без вклада

электростатических взаимодействий между комплементарными слоями в их структуре. Предложено использование этих капсул для доставки как гидрофильных, так и гидрофобных веществ. Впервые для полимерных мультислойных капсул показано, что из протеолитических энзимов, специфически катализирующих гидролиз белков по определенным звеньям цепи (трипсин и α -химотрипсин), для деградации капсул подходит только α -химотрипсин, благодаря его способности преимущественно расщеплять белки после остатков ароматических/гидрофобных (лейцина и метионина) аминокислот и неспецифической активности.

Важным практическим результатом разработки стало снижение стоимости материалов партии капсул в 7 раз по сравнению со стоимостью партии капсул полисахарид/полипептид аналогичной по содержанию частиц.

5. Соискателем систематически исследовано влияние присутствия полиолов на морфологию и размер частиц CaCO_3 , синтезируемых при смешивании солей CaCl_2 и Na_2CO_3 , в результате которого было установлено, что в присутствии полиолов влияние концентрации смешиваемых кальций- и карбонат-содержащих солей на размер частиц фатерита противоречит классической теории нуклеации и начальных стадий роста кристаллов: размер получаемых частиц уменьшается с уменьшением концентрации смешиваемых кальций- и карбонат-содержащих солей. Противоречит теории и влияние температуры, оказавшееся в присутствии в системе полиолов статистически незначимым. Среди исследованных физических параметров в согласии с теорией находилось влияние вязкости. Так, увеличение вязкости способствовало получению кристаллов фатерита меньшего размера. В результате исследования соискателем предложен воспроизводимый протокол получения наноразмерных частиц фатерита (средний диаметр $\bar{d} \sim 350$ нм).

6. Автором разработаны наноразмерные капсулы на основе биodeградируемых полимерных композиций; осуществлена их миниатюризация и загрузка низкомолекулярным соединением, служащим

моделью ряда лекарственных средств, включая противораковые препараты, универсальные пищевые добавки и традиционные фитолечения. Уменьшение диаметра капсулы ($\bar{d} \sim 280$ нм) по сравнению с диаметром её темплата ($\bar{d} \sim 490$ нм) было достигнуто соискателем в процессе термообработки суспензии капсул, которая приводит к дополнительной ионной «подшивке» капсульных слоёв за счёт увеличения подвижности и взаимопроницаемости полимерных цепей при высокой температуре. Важно отметить, что размер полученных капсул ($d = (280 \pm 90)$ нм) соответствует оптимальному размеру носителей, используемых в современной наномедицине.

В заключении диссертации автор приводит основные выводы о результатах исследования, которые соответствуют поставленным в диссертации целям и задачам.

Научная и практическая значимость результатов, полученных автором диссертации. Полученные соискателем научные результаты являются важными и обладают существенным потенциалом как в фундаментальном, так и в прикладном плане. В частности, работа вносит важный вклад в усовершенствование структуры и методов получения полимерных мультислойных капсул и уже только в этом аспекте послужит прочной эмпирической базой для решения целого ряда актуальных задач биомедицины, а также технологий, применяемых в косметической и пищевой промышленности. Например, метод «молекулярных коктейлей», как эффективный способ сохранения активности основного фактора роста и матричной РНК, может успешно применяться для разработки новых перспективных средств для лечения повреждений кожи и генной терапии. Выявление основного фактора перекисидации *in vitro* и разработанная на этой основе система антиоксидантной защиты эмульгированного масла имеют большой потенциал для уменьшения количества искусственных консервантов, используемых в косметике и продуктах питания.

Исследование механизма высвобождения макромолекул из биосовместимых капсул сыграет ключевую роль для разработок биофармацевтических препаратов на основе белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот. Установленная соискателем селективная чувствительность/стабильность мультислоёв на основе белка и полифенола к действию протеолитических энзимов закладывает фундамент для разработок капсульных систем доставки в кишечник тех биологически активных веществ, которые нуждаются в дополнительной защите при транспорте сквозь агрессивную среду желудка, таких как, например, неспецифические компоненты иммунной системы, пробиотики и пр. Важно, что низкая стоимость молекулярных составляющих для сборки таких микрокапсул открывает возможности для их широкого применения не только в медицине, но и в качестве ингредиентов функциональных пищевых продуктов и биодобавок. Возможность сборки стабильных капсул из сывороточных альбуминов как биосовместимых ингредиентов перспективна для «персонализированной» медицины. Капсулы могут собираться из белков, выделенных из крови конкретного пациента, с целью нивелирования отрицательного иммунного ответа и аллергических реакций на систему доставки. Простая в технологическом исполнении направленная пассивация поверхности капсул, собранных из других биосовместимых материалов, с помощью пары таниновая кислота/сывороточный альбумин также даст возможность нейтрализовать нежелательную активацию иммунной системы. Предложенное соискателем применение полиолов при выращивании темплатов фатерита заданного (желаемого) размера вносит вклад в общую систему знаний о физических процессах роста поликристаллов и имеет огромное значение для реализации потенциала полимерных мультислойных капсул в наномедицине.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Основные результаты и выводы диссертационной работы Антипиной Марии Николаевны рекомендуются как эмпирическая база для

инновационных разработок новых уникальных лекарственных средств, продуктов персонального использования, косметики и продуктов пищевой индустрии. Важным преимуществом использования разработок соискателя является возможность их прямого внедрения в биомедицинские технологии (эпигенетическое репрограммирование и технологии стволовых клеток).

Результаты и выводы диссертации могут быть включены в программу образовательных курсов по микро- и наноинкапсулированию для студентов, аспирантов и представителей индустрии.

По содержанию диссертационного исследования имеются следующие замечания:

Текст диссертации написан на русском языке, а почти все рисунки в диссертации являются «англоязычными» и содержат английские слова и термины, что обуславливает некоторый диссонанс в ее восприятии.

Известно, что использование метода послойной чередующейся адсорбции макромолекул для формирования капсул имеет существенный недостаток, ограничивающий возможности его практического применения, связанный с образованием агрегатов капсул в ходе послойного формирования их оболочек вследствие возникновения «мостиков» и сшивок между капсулами, обусловленных формированием поликомплексов макромолекул, связывающих капсулы друг с другом. Такие агрегаты в данной работе видны, например, на рис. 4.20, 5.6 и др. В работе отсутствует анализ данной проблемы и, соответственно, не ясно, какая доля полученных автором капсул существовала в виде индивидуальных частиц, а какая в виде агрегатов.

Заключение. Результаты диссертации Антипиной Марии Николаевны на тему «Полимерные мультислойные капсулы для обеспечения оптимального биоэффекта лекарственных препаратов и активных веществ» актуальны и обладают существенной научной новизной, они достоверны и являются полным и последовательным отображением поставленных цели и

задач. Опубликованные работы в полной мере отражают содержание диссертации. Выводы и практические рекомендации работы обоснованы. Таким образом, диссертация Антипиной Марии Николаевны является научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне. На основании выполненных автором исследований изложены научно обоснованные технологические решения в области микроинкапсулирования, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие инновационной экономики страны, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор – Антипина Мария Николаевна – заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

Отзыв обсуждён и единогласно утверждён на заседании кафедры биофизики физического факультета Московского государственного университета им. В.М. Ломоносова, протокол № 14 от 02 сентября 2016 года.

Заведующий кафедрой биофизики

физического факультета

ФГБОУ ВО «МГУ имени М. В. Ломоносова»

д.ф.-м.н., профессор




/В.А. Твердислов/

Адрес: 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1

Тел.: (495) 939-10-00, 203-65-65

Адрес электронной почты: info@rector.msu.ru