

## ОТЗЫВ

официального оппонента профессора Российской академии наук, доктора химических наук Калининой Марии Александровны на диссертацию Мищенко Екатерины Валерьевны на тему «Разработка способов получения и изучение свойств липидных наночастиц для доставки лекарственных соединений», представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 2.6.6. Нанотехнологии и наноматериалы.

Наноэмульсии (НЭ) и твёрдые липидные наночастицы (ТЛН) являются перспективными системами для доставки лекарственных соединений, так как способны доставлять маслорастворимые соединения к органам и тканям в организме. Необходимыми условиями носителей для реализации целевой доставки являются: биосовместимость, малый размер частиц и стабильность к агрегации и седиментации в течение длительного времени. Поэтому **актуальной задачей** является разработка и исследование устойчивых наноразмерных липидных носителей, предназначенных для доставки лекарственных соединений.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, раздела с результатами экспериментальных исследований и их обсуждением, заключения и списка цитируемой литературы. Материалы изложены на 161 странице, содержит 67 рисунков и 21 таблиц, введение, 3 главы, заключение и список используемых источников (188 наименований).

Во введении обоснована актуальность темы диссертации и степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования. Также представлены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту. Приведены сведения, которые подтверждают достоверность полученных результатов и личный вклад автора, указано число публикаций и описана структура диссертации.

В литературном обзоре приведен достаточно полный материал, который затрагивает основные аспекты получения НЭ и ТЛН. Рассмотрены процессы,

приводящие к дестабилизации липидных носителей. Приведены области их применения, в частности, применение в медицине.

В экспериментальной части описаны использованные в работе химические соединения. Затем подробно рассмотрены методики проведения и аппаратного оформления процессов получения и исследования НЭ и ТЛН, методами динамического рассеяния света, просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и крио-ПЭМ, метод кондуктометрии, метод дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК) и микрокалориметрии. Для исследования устойчивости НЭ и дисперсий ТЛН к седиментации использовались оптические методы, основанные на пропускании и обратном светорассеянии. Содержание данного раздела позволяет считать, что полученные автором данные являются достоверными.

Основные результаты и их обсуждение представлены в третьем разделе диссертации. В первой части третьей главы уделено внимание изучению влияния полярности липидного ядра и типа ПАВ на агрегативную и седиментационную устойчивость липидных носителей. В работе были исследованы наночастицы с неполярным и полярным липидным ядром, стабилизированные смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 или Tween 80 и Span 80.

В первом разделе были определены температуры инверсии фаз в НЭ кондуктометрическим методом. Исходя из этого были получены прямые НЭ с парафиновым маслом или олеиновой кислотой. Показано, что НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла или олеиновой кислоты, стабилизированные смесью ПАВ Tween 60 и Span 60, суммарной концентрацией 12,5 об.% являются устойчивыми к агрегации и седиментации более 30 сут. При использовании смеси ПАВ Tween 80 и Span 80 для стабилизации НЭ происходило образование капель с бимодальным распределением по размерам и последующей коагуляцией капель дисперсной фазы в течение суток. Предложены механизмы укрупнение капель дисперсной фазы НЭ. НЭ, стабилизированные смесью ПАВ Tween 60 и Span 60, проявляли устойчивость при повышенных температурах.

Во втором разделе было установлено, что суспензии ТЛН из стеариновой кислоты или парафина, стабилизированные смесью ПАВ Tween 60 и Span 60, суммарной концентрацией 15,0 об.% проявили наибольшую устойчивость к

агрегации и седиментации. При этом при стабилизации Tween 60 и Span 60 дисперсии ТЛН с неполярным ядром характеризовались более высокой агрегативной и седиментационной устойчивостью при более низкой концентрации ПАВ, чем дисперсии ТЛН с полярным ядром. Полученные системы также проявляли стабильность к коагуляции при температурах до 55 °С.

В третьем разделе для исследования структуры и свойств НЭ и ТЛН, как ненагруженных, так и нагруженных ЛС, были получены термограммы нагревания и охлаждения систем разного состава. Для идентификации пиков были определены температуры плавления отдельных компонентов, входящих в состав НЭ и ТЛН в объёмном и переохлажденном объёмном состоянии, методом ДСК. Исходя из термограмм плавления, было сделано предположение о строении капель дисперсной фазы НЭ и ТЛН. В случае НЭ полярность ядра незначительно влияла на структуру капель дисперсной фазы. После получения нанокapsулы были образованы жидким ядром из парафинового масла или олеиновой кислоты и твёрдой оболочки, образованной ПАВ: Tween 60 и Span 60. Однако при втором цикле нагревания-охлаждения в случае НЭ с полярным ядром происходило перераспределение компонентов, и олеиновая кислота частично встраивалась в адсорбционный слой, а небольшое количество ПАВ переходило в ядро капель.

В случае ТЛН полярность ядра влияла на структуру частиц: ТЛН из стеариновой кислоты состояли из липидного ядра, образованного переохлажденным расплавом стеариновой кислоты, и покрыты твердообразным адсорбционным слоем ПАВ с небольшими включениями стеариновой кислоты. ТЛН из парафина состояли из твёрдообразного парафинового ядра и твёрдообразной оболочки смеси ПАВ Tween 60 и Span 60.

Для определения распределения ЛС в НЭ и ТЛН были определены температуры плавления смесей липид/лекарственное соединение и ПАВ/лекарственное соединение, а также температурные характеристики НЭ и ТЛН с инкапсулированными доксорубицином и тимохиноном. Также было проведено изучение поверхностно-активных свойств данных лекарственных соединений. На основании этих данных, был сделан вывод, что данные лекарственные соединения могут встраиваться как в липидное ядро, так и в адсорбционный слой ПАВ во время получения липидных наночастиц.

В четвертой части третьей главы изучены потенциальные области применения липидных наночастиц. Были исследованы эффективности накопления и локализации НЭ и твёрдых липидных частиц в раковых клетках *in vitro* на клеточных линиях аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7), глиомы головного мозга крысы (C6) и рака толстой кишки человека (HCT-116). Показано, что липидные наночастицы размером 50 нм быстрее проникали внутрь клеток, распределялись во внутриклеточном матриксе и накапливались в ядрах, а то время как частицы размером 200 нм за то же время успевали лишь проникнуть внутрь клетки. Также была проведена оценка цитотоксичности НЭ и ТЛН ненагруженных и нагруженных лекарственными соединениями. Показано, что благодаря своей низкой цитотоксичности НЭ и ТЛН могут быть использованы в качестве систем доставки лекарственных соединений. Цитотоксичность нагруженных доксорубицином или тимохиноном липидных наночастиц резко возрастала, что косвенно также подтверждает встраивание данных лекарственных соединений в капли НЭ и ТЛН.

В работе также были получены устойчивые к коагуляции в течение более 20 сут НЭ, стабилизированные смесью ПАВ Tween 80 и Span 80, а также дополнительно катионными ПАВ цетилтриметиламмоний бромидом (ЦТАБ) или *n*-[2-((бутилкарбамоил)окси)этил]-*n,n*-диметилгексадекан бромидом аммония (УР-16). Исследование противовоспалительной активности НЭ, содержащих индометацин и модифицированных катионогенными ПАВ, показало, что максимальный противовоспалительный эффект был достигнут при использовании НЭ с добавлением 1 мас.% УР-16. Таким образом был сделан вывод, что НЭ и ТЛН могут быть использованы как системы доставки разных типов ЛС.

Показано альтернативное применение ТЛН из пчелиного воска. Были получены аналоги темперных красок на основе дисперсий ТЛН из пчелиного воска и минеральных пигментов. С помощью гелеобразователя Carbopol 940 были получены устойчивые к седиментации дисперсии ТЛН.

В заключении приведены достаточно полные и обоснованные выводы по проведенным исследованиям, а также представлены перспективы их дальнейшего развития. Имеется список сокращений. Список литературы оформлен в

соответствии с требованиями и содержит в себе актуальные российские и зарубежные источники.

Таким образом, диссертационная работа Мищенко Е.В. представляет высококвалифицированное систематическое исследование, в котором на высоком методическом уровне изучены получения, свойства и применения НЭ и ТЛН. Были разработаны новые составы и определены оптимальные условия для получения высокоустойчивых НЭ и дисперсий ТЛН. Результаты исследования имеют научную новизну и несомненную практическую значимость для разработки и применения липидных наночастиц в качестве систем доставки липофильных и амфифильных лекарственных соединений

Основные результаты работы опубликованы в 17 печатных работах, в том числе в 3 статьях в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации и индексируемых в системах цитирования Web of Science и Scopus, и тезисах семи докладов на научных конференциях.

Автореферат и опубликованные работы автора полностью отражают содержание диссертации.

По диссертационной работе имеются следующие замечания:

1. В качестве главного замечания к этой работе оппонент не может не отметить несоответствие качества подготовки текста тому уровню представления, которого бы заслуживала эта работа. оформлена небрежно, по всему тексту диссертации встречаются множественные грамматические ошибки, в первую очередь, несогласованность времен и падежей, синтаксические ошибки, а также большое количество опечаток, пропущенных или дублирующих слов, букв и цифр. Небрежность оформления затрудняет восприятие текста и снижает общее впечатление от хорошей экспериментальной работы.

Ниже приведено лишь небольшое число типичных примеров допущенных автором недочетов в оформлении диссертационной работы:

- Воздействие низких температур приводит к увеличивают хрупкости липидов и, следовательно, способствуют более глубокому измельчению частиц.
- но основными недостатками метода являются энергоёмкость процесса
- НЭ поучали пропусканием
- данном случае переход от систем М/В к В/М проходило через



- размер получаемых методом температурной инверсии фаз капель зависело от того,

- Были проведено исследование

- Причины и скорость перехода одной модификации в другую изучено не до конца

2. В заключение раздела 3.1.1., где обсуждаются температурные диапазоны инверсии фаз в исследуемых системах, автор пишет, что «меньший температурный диапазон связан с некоторым включением молекул олеиновой кислоты в адсорбционный слой, что влияло на межфазное натяжение и, как следствие, на скорость протекания ТИФ». Это некорректная формулировка, поскольку температурный интервал фазового перехода, как и межфазное натяжение, это термодинамические характеристики, а скорость протекания ТИФ – кинетическая.

3. В разделе 3.1.2 утверждается, что «Низкая устойчивость к коалесценции капель в НЭ, стабилизированных смесью ПАВ Tween 80 и Span 80, вероятнее всего связана с низким поверхностным зарядом (Таблица 3.2).» В то же время, из таблицы следует, что величина дзета-потенциала для этой смеси ПАВ выше в случае системы с неполярным ядром, чем для смеси Tween 60 и Span 60, образующей устойчивые НЭ такого типа.

4. Раздел 3.1 заключается выводом о том, что «полярность вещества, составляющего ядро, влияет как на размер, так и на агрегативную и седиментационную устойчивость НЭ. Полярное вещество наиболее вероятно частично встраивается в адсорбционный слой». Эта формулировка представляется чрезмерно обобщенной, поскольку способность вещества ядра встраиваться в оболочку из ПАВ скорее определяется его молекулярным строением и ГЛБ и только опосредованно – его полярностью.

5. В разделе 3.3.1 были изучены фазовые переходы как в индивидуальных ПАВ, так и в их смесях. Автор обсуждает наличие двух пиков на термограмме чистого Tween 60 и предполагает, что он связан со «структурным переходом при нагревании вещества, которое отсутствовало на термограмме переохлаждённого». Проводились ли повторные измерения и воспроизводится ли этот пик, и если да, то проводился ли анализ чистоты использованного ПАВ для подтверждения/исключения наличия в нем примесей?

6. В этом же разделе автор утверждает, что для смеси Tween 60/Span 60 положение одного пика находится выше температуры плавления первого ПАВ, а положение другого немного ниже температуры плавления второго потому, что смесь ПАВ разделилась на две фракции с более высоким и более низким содержанием Tween 60. В то же время, наблюдаемая термическая картина скорее соответствует неполному разделению этой смеси с обогащением каждой из фракций другим компонентом из-за сильных взаимодействий между ними.

7. В разделе 3.3.3, посвященном изучению НЭ и ТЛН с инкапсулированными лекарственными соединениями не приводится обоснование выбора лекарственных средств, а также не обоснованы использованные соотношения компонентов (не приводятся собственные экспериментальные данные или ссылки).

8. В разделе 3.4.1, посвященном изучению проникновения созданных липидных систем в раковые клетки, возникает путаница с использованием термина «липидная частица». Автор обсуждает проникновение частиц НЭ на основе углеводородного масла в ядра клеток, в то время как липидные частицы на основе стеариновой кислоты, которые в предыдущих разделах обозначались как ТЛН, в ядро не проникают. При этом автор особым образом подчеркивает, что «Накопление липидных наночастиц в ядрах клеток является достоинством при использовании противораковых ЛС».

9. Раздел, посвященный цитотоксичности созданных автором систем существенно выиграл бы с точки зрения практической значимости, если бы был дополнен сравнением с данными об их цитотоксической активности в отношении здоровых (не раковых) клеток.

Указанные выше замечания не являются принципиальными и в определенной части носят рекомендательный или дискуссионный характер.

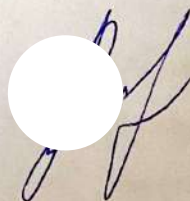
Считаю, что диссертационная работа Мищенко Екатерины Валерьевны «Разработка способов получения и изучение свойств липидных наночастиц для доставки лекарственных соединений» является завершенным научным исследованием, по своей актуальности, научной новизне, объему и практической значимости полученных результатов соответствует требованиям, установленным Положением о порядке присуждения степеней в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский

химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», утверждённым приказом ректора №1523ст от 17.09.2021 г., предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, и соответствует паспорту специальности 2.6.6 Нанотехнологии и наноматериалы, а ее автор Мищенко Екатерина Валерьевна достойна присуждения степени кандидата химических наук по специальности 2.6.10 Нанотехнологии и наноматериалы.

Официальный оппонент, профессор РАН, доктор химических наук (докторская диссертация по специальности 02.00.04 Физическая химия и 02.00.11 Коллоидная химия), ведущий научный сотрудник лаборатории биоэлектрохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук

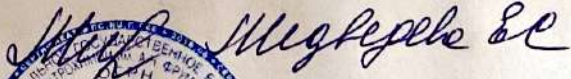
Калинина Мария Александровна

Институт физической химии и  
электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН  
119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.  
31, корп. 4,  
Телефон: +7 495 955 46 80  
e-mail: kalinina@phychе.ac.ru



Подпись Калининой Марии

Александровны удостоверяю

Начальник отдела кадров 

Институт физической химии  
электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН

11.08.2023г

