

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

профессора РАН, доктора химических наук

Калининой Марии Александровны

на диссертационную работу Широких Анастасии Дмитриевны на тему «Липидные наночастицы как средства доставки биологически активных соединений», представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 2.6.6. Нанотехнологии и наноматериалы

Липидные наночастицы различного состава являются перспективными носителями биологически активных соединений для ряда областей применения благодаря своей биодоступности, биосовместимости, низкой токсичности и способности доставлять различные по природе и свойствам соединения через естественные барьеры организма. Необходимыми условиями для внедрения таких носителей в практику применения являются простота получения липидных наночастиц с заданными свойствами, их стабильность в различных условиях и технологических процессах. В связи с этим, **актуальной задачей** является исследование возможности получения устойчивых дисперсий липидных частиц различными способами для достижения возможности их долгосрочного хранения и повышения перспективы применения в дерматологии, офтальмологии, косметологии или иных областях в качестве носителей лекарственных или биологически активных соединений.

Представленная Широких А.Д. по данной тематике диссертация состоит из введения, трёх глав (обзор литературы, методическая часть, обсуждение результатов), заключения и списка литературы. Материалы диссертации изложены на 236 страницах, включая 71 рисунок, 26 таблиц и список используемых источников из 341 наименования.

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 обзоре литературы приведены достаточно обширные сведения о различных типах липидных наночастиц: наноэмульсий, твердых липидных наночастиц (ТЛН) и наноструктурированных липидных частиц (НЛЧ). Описано влияние различных параметров на физико-химические свойства их дисперсий, рассмотрены некоторые технологические аспекты обработки дисперсий после их получения (стерилизация, лиофилизация), потенциальные области их применения.

Во второй главе диссертации описаны использованные в работе реактивы, методики получения и исследования изучаемых объектов, включающие метод динамического светорассеяния, просвечивающей электронной микроскопии, лазерной доплеровской велосиметрии, дифференциальной сканирующей калориметрии, инфракрасной спектроскопии. Описаны способы лиофилизации и стерилизации полученных дисперсий наночастиц, методы оценки их биологического воздействия. Содержание данного раздела подтверждает **достоверность** полученных автором результатов.

В третьей главе диссертационной работы представлены основные результаты и их обсуждение, посвященные условиям получения липидных наночастиц различного состава, их структуре, дисперсности, агрегативной и седиментационной устойчивости, лиофилизации и стерилизации их дисперсий, потенциалу их применения.

В первом разделе третьей главы были кондуктометрическим методом определены температуры инверсии фаз в системах с липидными наночастицами со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином. Было показано, что инверсия фаз в изучаемых системах происходит в диапазоне температур 85-95 °С.

Далее автором были изучены дисперсность и устойчивость дисперсий липидных наночастиц, полученных методом температурной инверсии фаз. Было показано, что липидные наночастицы со стеариновой кислотой и углеводородным маслом, а также НЛЧ со стеариновой кислотой и парафином имели сферическую форму, а их средний диаметр не превышал 40 нм. ТЛН с парафином, в свою очередь обладали средним диаметром до 68 ± 6 нм, а включение в их состав углеводородного масла приводило к снижению размеров наночастиц до 28-35 нм. Обнаружено, что все полученные дисперсии обладали агрегативной и седиментационной устойчивостью на протяжении периода изучения – 30 сут.

Третий раздел третьей главы работы был посвящен определению особенностей структуры получаемых липидных наночастиц посредством изучения фазовых переходов в их дисперсиях. Липидные наночастицы анализировали методом дифференциальной сканирующей калориметрии при нагревании от 20 до 95 °С, рассчитывая степень кристалличности липидов с учетом массовой доли компонентов. Показано, что с увеличением концентрации углеводородного масла в смеси со стеариновой кислотой до массового соотношения 1:1 снижается степень кристалличности наночастиц с $71,3 \pm 6,4$ до $33,6 \pm 3,0\%$. В связи с этим, автор высказывает предположение о формировании структуры, обогащенной стеариновой кислотой, разупорядоченной из-за встраивания углеводородного масла, ближе к поверхности липидных наночастиц. При смешении стеариновой кислоты и парафина также наблюдалось разупорядочивание кристаллической решетки стеариновой кислоты – степень кристалличности снижалась с $71,3 \pm 6,4$ до $19,6 \pm 1,8\%$ при тех же массовых соотношениях компонентов. Это позволило сделать предположение свидетельствовало о формировании структуры с неполярным липидным ядром, твердой оболочкой из ПАВ и фазой, обогащенной стеариновой кислотой, с малой степенью кристалличности между ними. При комбинировании углеводородного масла и парафина наблюдалась сегрегация на фазу, обогащенную парафином, и фазу с

повышенной концентрацией углеводородного масла. Степень кристалличности фазы, обогащенной парафином, снижалась со 100 до $74,3 \pm 6,7\%$. Таким образом, в данном разделе были установлены предполагаемые структуры получаемых наночастиц, что будет способствовать более эффективному инкапсулированию активных веществ в них.

В разделе 4 была рассмотрена пригодность к лиофилизации дисперсий полученных липидных наночастиц для увеличения удобства и потенциального срока их хранения. Автором показано, что ТЛН с парафином, а также парафином и стеариновой кислотой не пригодны к лиофильной сушке и последующему хранению в связи с их агрегацией. Липидные наночастицы со стеариновой кислотой, стеариновой кислотой и углеводородным маслом, углеводородным маслом и парафином могут быть подвержены лиофилизации для последующего редиспергирования и применения. Наиболее эффективен данный процесс для липидных наночастиц с углеводородным маслом и парафином – они сохраняют свои характеристики после лиофилизации не менее чем в течение 6 мес.

Пятый раздел главы 3 посвящен ряду вопросов, связанных с потенциальным применением полученных дисперсий наночастиц. Была оценена возможность инкорпорирования в них радиофармацевтического препарата стеарата иттрия, биологически активных соединений лютеина и астаксантина, изучено влияние включения данных соединений на характеристики наночастиц. Изучена возможность стерилизации дисперсий наночастиц ионизирующим излучением с оценкой влияния поглощенной дозы на свойства данных дисперсий и эффективности стерилизации на примере грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных *Escherichia Coli*. Показано, что высокая эффективность снижения микробиологической активности наблюдалась при облучении с дозой не менее 15 кГр по отношению к грамположительным бактериям и не менее 5 кГр по отношению к грамотрицательным. Биодоступность и потенциал применения

для доставки биологически активных соединений полученных дисперсий наночастиц были показаны при моделировании гемической гипоксии на куриных эмбрионах в случае инкапсулирования астаксантина и лютеина и при исследовании токсичности на лабораторных мышах в случае включения в состав дисперсий липидных наночастиц куркумина и наночастиц диоксида церия.

В заключении представлены обоснованные выводы, в полной мере обобщающие полученные результаты, а также предложены перспективы дальнейшего развития тематики.

Список литературы оформлен в соответствии с требованиями и содержит в себе актуальные, в основном за последние 5-10 лет, российские и зарубежные источники.

Таким образом, диссертационная работа Широких А.Д. представляет актуальное, систематическое, выполненное на высоком научно-методическом уровне исследование, в котором изучен широкий круг вопросов, связанных с получением, структурой, свойствами, условиями хранения и потенциалом применения липидных наночастиц различного состава. Результаты исследования имеют **научную новизну и практическую значимость** для дальнейшего применения липидных наночастиц в качестве систем доставки соединений, обладающих биологической активностью.

Основные результаты работы опубликованы в 29 печатных работах, в том числе в 3 статьях в ведущих рецензируемых научных журналах, индексируемых в системах цитирования Web of Science и Scopus, 26 работ в материалах всероссийских и международных конференций, форумов, конгрессов.

Автореферат и опубликованные работы автора полностью отражают содержание диссертации.

По диссертационной работе имеются следующие вопросы и **замечания**:

- 1) В экспериментальной части следовало более четко указать, что методики, которые были использованы автором для приготовления

липидных частиц и наноэмульсий, уже были разработаны ранее в научной группе, в которой выполнялась диссертационная работа. Использование тех или иных мольных соотношений ПАВ и компонентов дисперсной фазы также стоило бы кратко обосновать для удобства читателя, а не ограничиваться одной лишь ссылкой на предшествующую работу научного руководителя.

- 2) Чем обусловлено относительно низкое значение максимума электропроводности для соотношений компонентов дисперсной фазы 3:1 и 1:3 на рис.3.2 и какова воспроизводимость этих кривых (следовало отметить разброс значений на кривых)?
- 3) Обсуждение изменения размера частиц дисперсной фазы в зависимости от соотношений тех или иных компонентов выглядит несогласованным с физико-химической точки зрения и очень кратким. Автор затруднила себе сравнительный анализ табличным представлением данных, в то время как построение соответствующих кривых позволило бы четко увидеть, в каких случаях автор имеет дело с монотонными зависимостями, а в каких – с кривыми с экстремумами, которые ясно указывают на соответствующие отклонения фазового поведения изучаемых смесей от идеального, обусловленные взаимодействиями компонентов.
- 4) Эта же причина (неудачно выбранный формат представления и анализа данных) привела к несогласованности объяснения наблюдаемых результатов по изменению размера частиц с данными ДСК, согласно которым ПАВ существенно больше влияет на кристалличность парафина, чем стеариновой кислоты, при этом кристалличность частиц, содержащих ее смесь с маслом по этим данным снижается монотонно, а с парафином – нет, и характер зависимости снижения температуры плавления не соответствует характеру снижения кристалличности (с.122)

- 5) На с. 135 автор связывает укрупнение частиц со стеариновой кислотой при длительном хранении при -25°C относительно хранившихся при 20°C с перекристаллизацией, несмотря на то, этот процесс при пониженной температуре должен быть существенно затруднен. Этому объяснению противоречит вывод на с. 138 – аналогичный процесс перекристаллизации при низкой температуре для частиц с парафином и кислотой приводит, напротив, к уменьшению размеров и объема кристаллической структуры. Возможно, стоило рассмотреть возможность включения воды в оболочку ПАВ, обогащенную стеариновой кислотой?
- 6) Как связана агрегация частиц с сохранением их постоянного размера с перекристаллизацией парафина при лиофилизации (с.143)? Почему перекристаллизация провоцирует агрегацию?
- 7) Почему встраивание астаксантина и лютеина в слой ПАВ должно приводить к уменьшению размеров частиц (с.173)? Изменение плотности упаковки слоя и его фазового поведения в ту или иную сторону не является самоочевидным следствием просто из поверхностной активности добавки, особенно при относительно небольшом содержании последней, и подобное заключение требует корректного экспериментального физико-химического обоснования. Кроме того, если бы этот вывод был верен, то добавки встраивались бы в слой ПАВ (состав которого не изменялся) во всех системах и оказывали бы аналогичный эффект без исключений, которые автор, тем не менее, наблюдала (дисперсии масло/парафин и НЭ с маслом). Встраивание вместе с СК в слой ПАВ также не является объяснением наибольшей выраженности эффекта в такой системе – из результатов ясно следует, что большее значение имеют взаимодействия добавок с самой стеариновой кислотой, а не с ПАВ.

- 8) Активные вещества вводили в расплав дисперсной фазы. Сохраняют ли они свою биоактивность (которая не равна биодоступности) при таком способе приготовления частиц?
- 9) На рис. 3.1 неудачно выбраны цвета кривых, следовало бы заменить цветовую дифференциацию на нумерацию.
- 10) На Рис.3.30, 3.34, 3.38 нет размерной шкалы на фотографии и соответствующих указаний в подписи к рисунку.
- 11) Рис. 3.57-58 перегружены, можно было объединить их в колонки, оставив подписи по осям только для нижних.

Тем не менее, указанные замечания не снижают общего уровня выполненной работы.

По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям диссертация соответствует паспорту специальности научных работников 2.6.6. Нанотехнологии и наноматериалы в части п. 3.1. Экспериментальные исследования процессов получения и технологии наноматериалов, формирования наноструктур на подложках, синтеза порошков наноразмерных простых и сложных оксидов, солей и других соединений, металлов и сплавов, в том числе редких и платиновых металлов и п. 3.2. Выявление влияния размерного фактора на функциональные свойства и качества наноматериалов.

Считаю, что диссертация Широких Анастасии Дмитриевны «Липидные наночастицы как средства доставки биологически активных соединений» является завершенным научным исследованием и 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 №103 ОД от 14.09.2023 г. (в актуальной редакции),

предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Широких Анастасия Дмитриевна, достойна присуждения степени кандидата химических наук по специальности 2.6.6. 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 РАН

Калинина Мария Александровна



02.09.2025

Институт физической химии и
электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН
119071, г. Москва, Ленинский проспект,
д. 31, корп. 4,

Телефон: +74959554680

e-mail: kalinina@phyche.ac.ru

Подпись Калининой Марии
Александровны удостоверяю



зав. кафедр. Электрохимии



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