

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Седякиной Натальи Евгеньевны «Получение и исследование свойств хитозановых микросфер как систем контролируемой доставки инсулина», представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 02.00.11 – коллоидная химия

Согласно определению Всемирной организации здравоохранения, диабет является одним из самых распространенных заболеваний на земле, получившим статус неинфекционной эпидемии XXI века. По оценкам экспертов ВОЗ, в 2012 году 1,5 миллиона смертей произошло по причине диабета. В 2014 году уровень заболеваемости диабетом в мире составил 9% среди взрослого населения 18 лет и старше, при этом число больных удваивается каждые 15 лет. Основную тяжесть эпидемии несут на себе люди в странах с низким и средним уровнем дохода, и что эта болезнь затрагивает гораздо больше людей трудоспособного возраста, чем считалось ранее. Россия занимает пятое место в мире по распространенности этого заболевания.

Важно отметить, что доля случаев диабета первого типа или злокачественного течения диабета второго типа, которое быстро приводит к инсулиновой зависимости, также постоянно растет. В настоящее время единственная одобренная и рекомендованная ВОЗ форма гормонзаместительной терапии для больных с инсулин-зависимой формой диабета – инъекционная, которая причиняет дискомфорт, инфекционно опасна и травматична. На протяжении нескольких десятилетий (с конца первой половины прошлого века) не прекращаются исследования, связанные с разработкой препаратов инсулина, пригодных для перорального приема. Наибольшее развитие и, фактически, второе дыхание эта область науки получила в связи с взрывным интересом к наносистемам и появлением нанотехнологий как отдельного сектора науки и экономики.

С начала 90-х годов XX века в разработке стратегий синтеза препаратов инсулина для пероральной доставки начали активно использоваться подходы и методы, традиционные для современной коллоидной химии. Сегодня основной упор в этой области делается на так называемые биосовместимые сомальные системы доставки (традиционные липосомы и их новые формы, такие, как нисомы и трансферосомы), полимерные и гелевые нано- и микрочастицы. Тем не менее, несмотря на значительные успехи в этой области, до настоящего времени ни один из препаратов на основе нано- или микродисперсных систем не вошел в клиническую практику, что связано, прежде всего, с целым комплексом проблем, которые до сих пор не решены в полном объеме и включают в себя эффективность иммобилизации инсулина и его доставки в кишечный тракт без разрушения носителя или самого белка в сильноокислой среде желудка, насыщенной активными лизирующими агентами (пепсинами), контроль

скорости высвобождения белка, стабильность и токсичность таких систем и др.

Таким образом, разработка новых подходов к получению пероральных средств доставки инсулина является исключительно актуальной задачей. В этой связи актуальность и практическая значимость диссертационной работы Н. Е. Седякиной, посвященной получению и экспериментальному исследованию коллоидно-химических свойств хитозановых микросфер как систем контролируемой доставки инсулина, не вызывают сомнений, а использование полиглицерил полиолеатов в качестве стабилизирующих ПАВ для микроэмульсионного синтеза микрочастиц в значительной мере обуславливает новизну такого исследования

Диссертационная работа Седякиной Н. Е. изложена на 177 страницах печатного текста и состоит из введения, литературного обзора, главы, в которой изложены экспериментальные методики, главы, посвященной основным результатам и их обсуждению, а также основных выводов. Список цитируемой литературы насчитывает 191 наименование. Работа включает 96 рисунков и 20 таблиц.

Литературный обзор (**Глава 1**) начинается с весьма важного и полезного раздела, в котором обсуждаются основные типы систем на основе биоразлагаемых полимеров для пероральной доставки лекарственных средств (ЛС) различной природы. Отмечено многообразие полимерных соединений, которые могут быть использованы для этих целей. Второй раздел обобщает литературные сведения непосредственно об использовании хитозана для создания микро- и наноразмерных носителей ЛС, в том числе, инсулина. Подробно описаны свойства хитозана и методы получения микросфер на его основе, приводится сравнительное обсуждение их недостатков и преимуществ. Особо отмечается зависимость механизма сшивки молекул хитозана лимонной кислотой в обратных эмульсиях от температуры, а также приводятся известные данные по высвобождению белков из полимеризованных микросфер на основе хитозана. Далее обсуждаются вопросы, связанные с разработкой подходов к увеличению стабильности микроэмульсий, которые могут быть использованы для получения хитозановых микросфер. Приведены базовые сведения о свойствах и строении эмульсий и их стабилизации с помощью различных ПАВ. Подчеркивается ограниченность сведений о взаимосвязи физико-химических свойств исходных эмульсий и конечных характеристик микросфер, таких как размеры, полидисперсность, эффективность включения БАВ и кинетика его высвобождения. Особое место занимает важный раздел с подробным описанием метода стабилизации с использованием поверхностно-активных полимеров, позволяющий полностью обосновать выбор этого метода в качестве одного из основных для выполнения диссертационной работы. Литературный обзор завершается вполне обоснованной постановкой задач исследования.

Вторая глава посвящена описанию использованных в работе материалов и экспериментальных методов исследований. В качестве основных объектов исследования были выбраны хитозан, сшивающий агент – лимонная кислота, человеческий генно-инженерный инсулин Актрапид, полимерные ПАВ: полиглицерил-6-полирицинолеат-15 (ПГ-6-ПР) и полиглицерил-10-полирицинолеат-20 (ПГ-10-ПР), а также Твин-80. Выбор каждого соединения обоснован с позиций задач работы. Приведены характеристики и других компонентов смешанных систем, подробно описаны методики приготовления эмульсий вода-масло и их состав.

Исключительно тщательно и подробно описаны методы исследования, которые были использованы в работе: метод висящей капли для измерения поверхностного натяжения в смешанных системах, метод титрования эмульсий и измерение их реологических свойств (вязкости) с помощью капиллярного вискозиметра, измерения оптической плотности для определения рН-диапазона растворимости хитозана, спектрофотометрическое титрование, фотон-корреляционная спектроскопия и турбидиметрическое исследование кинетики взаимодействия хитозана с лимонной кислотой, ИК-спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии полученных хитозановых микросфер. Важной методической частью работы стало изучение высвобождения инсулина из микросфер данного типа, которое было проведено впервые.

Материал этой главы, относящийся к описанию объектов и методов измерения характеристик сложных эмульсионных систем, является базовым для понимания и оценки всей диссертации. Этот раздел работы написан четко, содержит необходимые формулы и иллюстрации и готовит читателя к анализу основных результатов работы, излагаемых в следующих главах.

Третья глава разбита на несколько разделов. В первом разделе обсуждаются поверхностные свойства исследованных полимерных ПАВ, как индивидуальные, так и в смесях, и данные измерений межфазного натяжения на границе раздела раствор уксусной кислоты-парафиновое масло. Автором получен целый ряд интересных результатов.

Было установлено, что полиглицерил-6-полирицинолеат снижает межфазное натяжение от 42 мН/м (0% ПГПР в системе) до 3,6 мН/м (4% масс. ПГ-6-ПР), полиглицерил-10-полирицинолеат – до 5,4 мН/м (4% масс. ПГ-10-ПР). На основании полученных изотерм межфазного натяжения построены изотермы гиббсовской адсорбции и рассчитаны параметры адсорбционного слоя неионогенных ПАВ на межфазной границе вода/масло. Установлено, что величины посадочных площадок исследуемых ПАВ сравнительно малы — 0,35 и 0,34 нм² для ПГ-6-ПР и ПГ-10-ПР. Автор интерпретирует этот результат как образование сплошного мономолекулярного слоя молекул ПАВ, в котором остатки рицинолевой кислоты ориентированы по нормали.

Также была проведена оценка зависимости межфазного натяжения на границе вода-масло от гидрофильно-липофильного баланса смесей

выбранных ПАВ с Твин-80. Показано, что Твин 80 позволяет понижать межфазное натяжение на границе раздела фаз до 3 раз по сравнению с индивидуальными ПАВ. Автор объясняет этот эффект синергизмом действия двух ПАВ, который подтверждается результатами расчета параметра межмолекулярного взаимодействия ПАВ в адсорбционном слое. Параметр принимает отрицательные значения для всех изученных смесей, что свидетельствует о межмолекулярном притяжении.

На основании данных этого раздела была определена система на основе ПГ-6-ПР, проявляющая наибольший синергизм поведения в смеси с Твин-80.

Следующий подраздел касается изучения адсорбции хитозана на межфазной границе в исследованных двухфазных системах. Согласно полученным изотермам межфазного натяжения смешанных систем хитозан – ПАВ, основной вклад в уменьшении межфазного натяжения на границе раздела фаз вносит поверхностно-активное вещество.

На основе полученных результатов автором было выдвинуто предположение о связывании молекул хитозана и ПГ-6-ПР, которое может происходить в водной фазе за счет образования водородных связей между гидроксильными группами ПАВ и протонированными и депротонированными аминогруппами хитозана.

Второй раздел посвящен обсуждению результатов исследования взаимодействий хитозана с лимонной кислотой при различных соотношениях реагентов, рН среды и температуре. Показано, что в индивидуальных растворах полимера при всех исследованных значениях рН присутствуют три фракции частиц, средний диаметр которых находится в диапазонах 15 – 20 нм, 250-300 нм и около 5 мкм, причем, первая фракция преобладает. Методом фотон-корреляционной спектроскопии было установлено, что в смесях с лимонной кислотой размер частиц зависит от массовых соотношений хитозан: лимонная кислота. При соотношении ниже 0,5 и рН 5,0 происходит значительный рост размеров частиц. Автор объясняет этот эффект образованием комплекса за счет возникновения ионных связей между положительно заряженными протонированными аминогруппами хитозана и отрицательно заряженными карбоксильными группами лимонной кислоты. Данные спектрофотометрического титрования и турбидиметрического исследования подтверждают это заключение.

В этом разделе также приводятся результаты турбидиметрии при различных температурах, которые свидетельствуют о повышении эффективности сшивки при увеличении температуры системы за счет высвобождения аминогрупп хитозана, доступных для сшивки, а также образования амидных связей между полимером и кислотой при высоких температурах. Согласно данным спектрофотометрического исследования кинетики комплексообразования, уже при 60 °С сшивка происходит даже в растворе с рН 4,0, что позволяет использовать такую систему для получения микросфер, избегая выпадения осадка.

Третий раздел касается исследования свойств обратных эмульсий, стабилизированных выбранными в данной работе полимерными ПАВ. Выбор

соотношения водной и масляной фаз и определение устойчивости стабилизированных эмульсий проводили с помощью построения так называемых треугольников Гиббса (фазовых диаграмм) на основании на основании данных, полученных в результате водного титрования смеси масло/ПАВ при комнатной температуре и при 60 °С.

Установлено, что при повышении температуры область расслоения увеличивается для обоих ПАВ, однако, системы на основе ПГ-6-ПР стабильны в более широком диапазоне условий вследствие меньшей гидрофобности этого соединения, ограничивающей его растворимость в масляной фазе. Эти системы были выбраны для дальнейшего изучения стабильности этих систем с помощью измерения кинетики расслоения и микроскопического исследования капель микроэмульсий. Было показано, что с увеличением содержания водной фазы скорость расслоения снижается за счет образования коагуляционной структуры. На основании полученных данных выбрано оптимальное соотношение вода-масло в изученных системах.

Влияние концентрации ПАВ на свойства обратных эмульсий оценивали по изменению распределения по размеру капель микроэмульсий, исследованных с помощью оптической микроскопии. Показано, что введение в систему полимерного ПАВ приводит как к уменьшению размера капель, так и к снижению полидисперсности. Наблюдаемый эффект автор связывает с формированием прочных адсорбционных слоев, создающих структурно-механический барьер на поверхности капель дисперсной фазы, а также с повышением вязкости дисперсионной среды за счет образования мицелл ПАВ, использованная концентрация которого выше ККМ. По тем же причинам увеличение концентрации ПГ-6-ПР способствует повышению агрегативной устойчивости системы и снижению скорости расслоения.

Увеличение эффективной вязкости при повышении концентрации ПАВ подтверждается и данными реологических исследований. С использованием кривых течения эмульсий с различным содержанием ПГ-6-ПР были определены значения предела текучести и критического напряжения сдвига. Увеличение предела текучести с ростом концентрации ПАВ автор объясняет структурообразованием в системе, которое создает сопротивление потоку и препятствует течению. Кроме того, по методу Потанина и Урьева был произведен расчет прочности единичных контактов, который показал, что природа контакта во всех системах – коагуляционная, а сами системы являются слабоструктурированными. Именно образование пространственно-протяженной коагуляционной структуры, по мнению автора, и является основной причиной седиментационной устойчивости изученных систем.

В этом же разделе изложены данные измерений размеров частиц, образующихся в смешанных эмульсионных системах хитозан-ПАВ. Интересно, что размер частиц уменьшается при добавлении хитозана до примерно 1.5 мкм, что свидетельствует о росте агрегативной устойчивости. Автор полагает, что повышение агрегативной устойчивости исследуемой системы связано с образованием комплекса полимер – ПАВ на межфазной

границе. Комплекс хитозан – ПГПР создает структурно-механический барьер, который стабилизирует капли дисперсной фазы, препятствуя процессам коагуляции и коалесценции, вследствие чего размеры капель не увеличиваются при выдержке эмульсий.

Следующий подраздел содержит обсуждение результатов исследования поведения многокомпонентных двухфазных систем при введении в них сшивающего агента для различных соотношений лимонная кислота-хитозан. По данным микроскопии, среднемассовый радиус капель эмульсии резко уменьшается уже при введении небольшой концентрации сшивающего агента, что свидетельствует о росте агрегативной устойчивости, при этом дальнейшее увеличение содержания лимонной кислоты на эту величину не влияет. Автор предполагает, что на поверхности капель образуется гелеобразный слой цитрата хитозана, который препятствует коалесценции.

В четвертом разделе обсуждаются свойства полученных хитозановых микросфер, иммобилизация в них инсулина и исследование его высвобождения в условиях, близких к физиологическим. Важным достижением данной работы стала демонстрация зависимости размера и степени агрегации выделенных частиц от состава исходной эмульсии. Было установлено, что увеличение концентрации ПАВ или хитозана провоцирует агрегацию, в то время как увеличение содержания лимонной кислоты приводит к обратному эффекту. Автор обнаружила интересный эффект уменьшения размеров выделенных частиц относительно размера капель исходной эмульсии в присутствии лимонной кислоты и объяснила его усадкой гелеобразного слоя цитрата хитозана в процессе сушки частиц. Для подтверждения взаимодействий хитозана и лимонной кислоты полученные микросферы были также исследованы с помощью ИК-спектроскопии.

Отдельный подраздел отведен описанию результатов изучения сорбции инсулина синтезированными хитозановыми микросферами из раствора белка в фосфатно-солевом буфере. Было установлено, что микросферы, полученные в присутствии ПГ-6-ПР, обладают большей способностью включать белок, по сравнению с образцами на основе ПГ-10-ПР, что вероятно, можно объяснить их меньшей степенью агрегации, следовательно, большей величиной удельной поверхности. Увеличение концентрации хитозана в исходной системе оказывает негативный эффект на сорбцию инсулина, что автор связывает с соответствующим увеличением степени сшивки и вязкости, препятствующих набуханию и диффузии молекул белка внутрь микросфер. В свою очередь, концентрация инсулина в растворе в диапазоне от 0,77 г/л до 1,17 г/л практически не влияет на эффективность включения, однако, при достижении концентрации 1,55 г/л сорбция несколько снижается. Увеличение времени выдержки микросфер в растворе белка закономерно приводит к росту величины сорбции.

Заключительный подраздел посвящен изучению кинетики высвобождения белка из хитозановых микросфер в фосфатно-солевой буфер при физиологическом значении рН 7,4 в зависимости от исходного состава микроэмульсии. Установлено, что с уменьшением содержания воды в

исходной системе от 80% до 20% масс. снижается скорость выделения инсулина, при этом процент первоначального высвобождения белка падает почти вдвое (до 61%). По мнению автора, полученный результат свидетельствует о том, что в процессе включения значительная часть молекул белка диффундирует внутрь полимерной матрицы микросфер. В системах с высокой концентрацией ПАВ, особенно на основе ПГ-10-ПР высокая скорость высвобождения инсулина коррелирует с низкой агрегативной устойчивостью таких систем. Увеличение содержания хитозана приводит к обратному эффекту и способно снизить скорость высвобождения почти вдвое, что согласуется с полученными данными о более высокой степени сшивки и возрастающих диффузионных ограничениях в таких системах. Тем не менее, при достижении определенного порогового значения концентрации до 0.4% масс. скорость высвобождения снова растет, поскольку инсулин не способен проникать внутрь капсул с высокой степенью полимеризации.

Наконец, при увеличении концентрации сорбционного раствора инсулина и времени выдержки в нем микросфер, время высвобождения белка уменьшается, поскольку оба фактора способствуют диффузии инсулина от поверхности микросфер во внутреннюю область частиц.

Практическая значимость проделанной работы логически вытекает из ее результатов: полученные данные могут быть использованы при разработке лекарственных композиций для пероральной доставки инсулина на основе хитозана и изученных ПАВ. Большое значение для практики имеют и выявленные автором эффекты влияния состава эмульсий, природы и концентрации использованных ПАВ на сорбцию белка и его высвобождение из хитозановых микросфер.

Замечания по материалу диссертационной работы сводятся к следующему.

Введение

Цель работы сформулирована неудачно. Коллоидно-химические основы той методики, которую предлагает автор для получения микросфер хитозана и введения в них инсулина, были разработаны и сформулированы ранее, о чем свидетельствуют ссылки на соответствующую литературу, которые автор добросовестно приводит. В данном случае цель работы скорее заключалась в разработке комплексной методики, объединяющей эти основы, для получения системы доставки инсулина с оптимальными и контролируемыми характеристиками.

Глава 1:

1) Часть литературных сведений вынесена в соответствующие разделы (см. разделы 3.1.1, 3.3.1 и 3.5.2), что нарушает целостность изложения литературного обзора и затрудняет его восприятие.

2) Несмотря на то, что работа посвящена иммобилизации инсулина в полимерных капсулах, во вводной части обзора следовало бы хотя бы кратко упомянуть и другие типы коллоидных систем, которые используются для инкапсулирования инсулина, такие, как липосомы и трансферосомы, поскольку в этой области достигнуты значительные успехи.

Глава 3

- 1) Нумерация подразделов раздела 3.3 не совпадает с той, что приводится в содержании.
- 2) Раздел 3.2 было бы целесообразно объединить с предыдущим подразделом, касающимся поведения хитозана на межфазной границе.

Раздел 1

С. 79 Автор утверждает, что «Гидрофобными группами, переходящими в масляную фазу в процессе адсорбции полимера на межфазной границе, являются ацетамидные и депротонированные аминокгруппы». Группы, способные к протонированию или образованию водородных связей, по определению не являются гидрофобными.

Раздел 2

1) Подписи к рисункам неполные, читателю трудно понять, к какой конкретно системе относятся данные рисунка 3.9.

2) С. 90 Автор утверждает, что «Как было показано выше (рис.3.8), при рН 4,0, когда диссоциация лимонной кислоты протекает только по одной карбоксильной группе [180], соотношении реагентов $X < 1$ и комнатной температуре, комплексообразование не происходит». Однако, на рис.3.10 - 3.11 приводятся данные, опровергающие это утверждение и свидетельствующие о преимущественном образовании мелкодисперсной фракции в таком растворе, как и в растворах с более высокими соотношениями компонентов. При этом полное отсутствие взаимодействий между лимонной кислотой и хитозаном при рН 4.0 и комнатной температуре довольно трудно объяснить, так как, по утверждению автора, сделанному на стр. 79, 90% аминокгрупп при данном рН находятся в протонированном состоянии, а, значит, способны к взаимодействию с карбоксилат-анионами лимонной кислоты даже при (относительно) низкой степени диссоциации последней.

3) В пользу взаимодействий между кислотой и хитозаном при этих условиях свидетельствуют и результаты УФ-спектрометрии растворов, выдержанных при различной температуре. Автор говорит о появлении дополнительных полос в спектре системы с рН 4.0 при ее нагревании выше 60 °С. В то же время, на спектре, записанном при комнатной температуре, в той же области также фиксируется заметное поглощение, хотя и менее выраженное, чем при более высокой температуре.

4) Выражение «совместный раствор» неудачно, следует использовать термин «смешанный раствор».

5) Неясно, почему автор проводила турбодимитрическое исследование растворов хитозана и кислоты при повышенной температуре только для систем с рН 5.0 и 5.7, хотя в дальнейшем были использованы только растворы с рН 4.0, для которых комплексообразование при 60 С было также выявлено.

Раздел 5

1) Наибольшим недостатком диссертации является отсутствие данных о поведении полученных микросфер в кислой и сильнокислой средах. Эти данные было бы нетрудно получить с помощью тех же методов, которые автор использовала в своей диссертационной работе. При этом они имеют принципиальное значение с точки зрения перспективности практического применения предложенной системы для пероральной доставки инсулина, поскольку автор неоднократно подчеркивает важность собственной устойчивости таких систем к действию кислот и ферментов желудочно-кишечного тракта.

2) Интерпретация данных ИК-спектроскопии проведена небрежно и вызывает вопросы. Автор пишет, что в спектре сшитого хитозана «в области 1800 – 1500 см⁻¹ появляются две полосы – 1728 и 1579 см⁻¹, которые соответствуют валентным колебаниям –С=О связи в алифатических карбоновых кислотах и ассиметричным валентным колебаниям –СОО– группы, соответственно». В то же время, при сравнении двух спектров видно, что полоса 1728 см⁻¹ имеет крайне малую интенсивность, сравнимую с шумом, а полоса 1579 см⁻¹ не появляется, а, скорее, смещается из положения 1587 см⁻¹. Также в спектре сшитого полимера смещается и полоса деформационных колебаний ОН-групп от 1419 к 1388 см⁻¹. Плечо в области 1690-1650 см⁻¹, отвечающее колебаниям амидных групп, также остается и в спектре сшитого хитозана.

3) Как автор объясняет противоречие между снижением сорбции белка микросферами в растворе с концентрацией инсулина 1.55 г/л и снижением высвобождения белка из этих же микросфер?

Высказанные замечания носят рекомендательный характер и не затрагивают основной сути диссертационной работы.

Диссертация Седакиной Н. Е. является законченной научно-квалификационной работой. Основные научные положения и выводы, изложенные в диссертации, оригинальны, перспективны для дальнейшего практического использования и являются результатом самостоятельной научно-исследовательской работы автора.

Автореферат и публикации, включающие 3 статьи в рекомендованных ВАК ведущих российских периодических изданиях и 12 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях, в полной мере отражают содержание диссертации.

Диссертационное исследование соответствует паспорту специальности научных работников 02.00.11 – коллоидная химия в части 1 (Поверхностные

силы, устойчивость коллоидных систем, смачивание и адсорбция) и части 2 (Теоретические основы действия поверхностно-активных веществ (ПАВ) на границах раздела фаз. Теория мицеллообразования и солюбилизации в растворах ПАВ).

Можно заключить, что диссертация Седякиной Натальи Евгеньевны «Получение и исследование свойств хитозановых микросфер как систем контролируемой доставки инсулина» удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, изложенным в Положении «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденном постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (пункты 9–14), а ее автор, Седякина Наталья Евгеньевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.11 – коллоидная химия.

Доктор химических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории физической химии
супрамолекулярных систем
Института физической химии и
электрохимии им. А.Н.Фрумкина РАН

М. А. Калинина

Подпись руки М. А. Калининой
Заверяю
Ученый секретарь ИФХЭ РАН
кхн Варшавская И.Г.



Москва 119071 Ленинский проспект 31 строение 4
тел. 8 495 955 44 08
e-mail: kalinina@phychе.ac.ru