

ОТЗЫВ

официального оппонента Мелик-Нубарова Николая Сергеевича

на диссертацию Садыковой Ольги Витальевны на тему:

«Влияние биологически активных молекул на фотосенсибилизирующую активность комплексов порфиринов с амфифильными полимерами в генерации синглетного кислорода», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.7 – Высокомолекулярные соединения.

Работа Садыковой О.В. посвящена созданию полимерных композиций для повышения эффективности антибактериальной фотодинамической терапии. Данный подход к лечению гнойных ран нашел широкое применение в клинике вследствие его высокой эффективности. Огромным преимуществом антибактериальной ФДТ является ее эффективность против бактерий, проявляющих устойчивость к антибиотикам. В то же время по сравнению с поверхностными бактериостатиками, порфириновые фотосенсибилизаторы могут глубоко проникать в раневую ткань, уничтожая бактерии в тех местах, которые могут подвергаться действию света.

В настоящее время предложен целый ряд подходов, позволяющих увеличить активность порфиринов в противобактериальной ФДТ. В частности, предложено усилить связывание порфиринов с отрицательно заряженными стенками бактерий за счет их ковалентного присоединения к поликатионам, катионным липосомам или антителам. Все эти подходы требуют сложного синтеза, который сопряжен с использованием потенциально токсичных реагентов, а значит, требуют тщательной очистки продуктов присоединения. В настоящей работе предложен изящный подход, состоящий во включении порфиринов в композицию, содержащую, помимо порфирина, еще три компонента: амфифильный полимер, анионный полисахарид и монооксида азота NO. Каждый из этих компонентов играет важную роль в данной смеси. Амфифильный полимер способен связывать фотосенсибилизатор и

обеспечивает его высокую фотокаталитическую активность. Анионный полисахарид обеспечивает увлажнение раневого ложа и смягчает неблагоприятные последствия ФДТ. И наконец, источник монооксида азота NO оказывает ярко выраженное противовоспалительное действие, облегчающее заживление раны. В клетках отсутствуют рецепторы на оксид азота (II), однако его ферментативный синтез NO-синтазами приводит к активации различных клеток иммунной системы – Т-лимфоцитов, естественных киллеров и макрофагов. NO вызывает расширение сосудов, что также способствует поступлению иммунных клеток к ране. Поэтому его продукция в ходе лечения гнойных ран представляет большой интерес. Все это делает данную работу чрезвычайно актуальной.

В работе впервые исследованы четырехкомпонентные системы, состоящие из порфирина, амфифильного полимера, альгината натрия и динитрозильного комплекса железа. Показано, что порфирин в таких системах взаимодействует только с амфифильным полимером, а другие компоненты просто смешаны с этим комплексом. Обнаружено, что, в отличие от смесей динитрозильного комплекса железа с порфирином в отсутствие полимеров, оксид азота в четырехкомпонентной системе не взаимодействует с триплетным возбужденным состоянием порфирина и поэтому не влияет на эффективность генерации синглетного кислорода. Таким образом, научная новизна работы не вызывает сомнения.

Работа Садыковой О.В. построена традиционным образом. Она состоит из введения и 5 глав, включающих обзор литературы, методическую часть и трех частей с изложением собственных результатов автора и их обсуждения. В диссертации также содержится приложение, в котором приведены данные испытаний полученного препарата на экспериментальных животных. Работа изложена на 132 страницах, содержит 11 таблиц и 56 рисунков. В обзоре литературы автор знакомит читателя с основными понятиями антибактериальной фотодинамической терапии, подробно останавливается на физикохимических механизмах ФДТ, фотофизических особенностях

фотосенсибилизаторов и особенностях их агрегации в водных растворах. Далее автор приводит основные сведения о свойствах растворов амфифильных полимеров, таких как поли(N-винилпирролидон) и плуроники, а также синтезе и основных свойствах динитрозильных комплексов.

Вторая глава диссертации, содержащая методическую часть, написана очень подробно. Основным методом измерения фотокаталитической активности порфиринов состоял в изучении кинетики фотоокисления триптофана в растворе. Поскольку в процессе реакции может окисляться также и фотосенсибилизатор, то особое внимание уделено обработке кинетических данных. Сложность данной задачи усугубляется при добавлении в реакционную смесь источника оксида азота (II) – динитрозильного комплекса железа. Это потребовало введения интерполяционного кинетического параметра ξ_i , учитывающего фотодеструкцию i -го компонента системы. Учет сопутствующих процессов распада фотосенсибилизатора и динитрозильного комплекса железа позволил автору вычленить влияние полимеров на константу скорости фотоокисления триптофана в такой сложной системе. Все использованные в работе физические методы исследования четырехкомпонентной системы также подробно обсуждены в экспериментальной части. Следует отметить, что экспериментальная часть написана с такой степенью подробности, что полученные результаты могут быть легко воспроизведены в любой лаборатории.

В третьей главе диссертации автор переходит к изложению результатов собственных исследований, посвященных влиянию полимеров на фотокаталитическую активность хлорина еб и фотодитазина и их комплексов с поли(N-винилпирролидоном). При этом оказывается, что образование комплекса фотосенсибилизатора с хлорином немного увеличивает начальную скорость фотоокисления триптофана, а добавление альгината натрия совершенно не влияет на фотокаталитическую активность. При этом альгинат не изменяет и скорость окисления самого фотосенсибилизатора.

Образование комплекса поли(N-винилпирролидона) и хлорина еб было также подтверждено методом ЯМР в растворе. Было показано, что наблюдается сдвиг в слабое поле сигналов мезо-протонов порфиринового цикла, периферийных метильных групп и остатков пропионовой кислоты в молекуле хлорина еб. В присутствии поли(N-винилпирролидона) и альгината натрия наблюдаются незначительные изменения величины хим. сдвига, порядка 0,1 м.д. (по сравнению с комплексами хлорина еб и поли(N-винилпирролидона)) сигналов мезо-протонов цикла для тройной смеси хлорина еб с двумя полимерами. Это может быть связано с конформационными изменениями макромолекул поливинилпирролидона.

В четвертой главе диссертации приведены результаты исследования трехкомпонентной системы хлорин еб-поли(N-винилпирролидон)-альгинат натрия методами рентгеновской дифракции и термогравиметрии. Особенность всех этих методов состоит в том, что они дают информацию о структуре твердой пленки. Информация, полученная из данных рентгеновской дифракции позволяет утверждать, что в твердой пленке альгинат и хлорин еб дают отдельные несмешанные друг с другом фазы. Поскольку невозможно предположить, что в растворе между альгинатом натрия и хлорином еб или поли(N-винилпирролидоном) есть взаимодействие, а при высушивании раствора оно разрушается, автор совершенно справедливо заключает, что и в растворе альгинат натрия не взаимодействует ни с порфирином, ни с поли(N-винилпирролидоном). Мне кажется, этот вывод сделан абсолютно корректно.

Данные АСМ не позволили получить информацию о взаимодействии хлорина еб с альгинатом натрия и поли-(N-винилпирролидоном), однако показали, что ПВП и альгинат натрия разделяются в пленке на отдельные фазы. Этот результат полностью согласуется с данными рентгеновской дифракции. Наконец, термогравиметрический анализ и дифференциальная сканирующая калориметрия позволили установить, что добавление хлорина еб к поли(N-винилпирролидону) повышает термостабильность полимера, что также указывает на образование комплексов.

Напротив, в полном соответствии с данными литературы, методы рентгеновской дифракции и термогравиметрии выявили взаимодействие между ПВП и хлорином еб. При этом оно заметно как по структуре пленок полимера, так и по изменениям спектров ЯМР.

Очень интересные результаты представлены в пятой главе диссертационной работы. К моменту ее начала было известно, что оксид азота (II), будучи свободным радикалом, способен реагировать с порфирином в триплетно-возбужденном состоянии. Естественно, это приводит к снижению фотокаталитической активности и нивелирует стимулирующее воздействие NO на иммунную систему организма. Однако оказалось, что включение хлорина еб в комплекс с поли(N-винилпирролидоном) в значительной мере защищает возбужденное состояние фотосенсибилизатора от воздействия NO. Аналогичный вывод делается и для гидрофобного фотосенсибилизатора, фторированного тетрафенилпорфирина – 5,10,15,20 – пентафторфенилпорфирин (ТФПФ20). Для установления этого факта автор подробно исследовал кинетику фотокаталитического окисления триптофана, а также кинетику фотодеструкции самого порфирина и динитрозильного комплекса железа.

Таким образом, в работе получен новый результат, представляющий большую практическую значимость: лекарственные формы порфириновых фотосенсибилизаторов для противобактериальной фотодинамической терапии могут содержать амфифильный полимер и динитрозильный комплекс железа. Кроме того, для увлажнения раны и уменьшения неблагоприятных эффектов ФДТ в состав следует добавлять альгинат натрия, который не взаимодействует с другими компонентами системы.

Как и любая работа, данная диссертация не свободна от некоторых недостатков.

1) На мой взгляд, в работе практически отсутствует информация о путях накопления порфиринов и их комплексов в бактериальных клетках. Между тем именно это определяет противобактериальное действие фотосенсибилизаторов.

Дополнение обзора литературы такой информацией без сомнения усилило бы данную работу.

2) Не совсем понятно, может ли ДНКЖ влиять на возбужденное состояние порфирина после его проникновения в клетку. Дело в том, что динитрозильные комплексы железа, использованные в работе, стабилизированы глутатионом, который в своем составе имеет три заряженные группы. Т.е. комплексы очень гидрофильны, и вряд ли в значительной степени могут накапливаться в клетках бактерий. В то же время порфирины, очевидно, проникают внутрь, и после облучения именно внутри клеток происходит генерация синглетного кислорода. Поэтому можно ожидать, что пагубное воздействие ДНКЖ на активность порфирина в водном растворе может и не наблюдаться в клетках бактерий. Думаю, работа сильно бы выиграла, если бы генерация синглетного кислорода и NO были бы исследованы именно на бактериальных клетках, а не только в водном растворе.

Все эти замечания не снижают общего, чрезвычайно благоприятного впечатления от диссертации Садыковой О.В. Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым ВАК России к кандидатским диссертациям, а её автор, Садыкова Ольга Витальевна заслуживает присвоения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.7 – Высокомолекулярные соединения.

Официальный оппонент

Ведущий научный сотрудник Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова
Доктор химических наук (1.4.7 – Высокомолекулярные соединения)



Мелик-Нубаров Николай Сергеевич
« 15 » мая 2023 г.

119234, г. Москва, лабораторный корпус "А", Ленинские горы, д.1, корп.40

Тел.: (495) 939-31-27, e-mail: melik.nubarov@belozersky.msu.ru

Подпись д.х.н. Мелик-Нубарова Николая Сергеевича заверяю

