

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРНЫХ
МАТЕРИАЛОВ им. Н.С. ЕНИКОЛОПОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИСПМ РАН)

117393, Москва, ул. Профсоюзная, 70

Тел./факс: (495) 335-91-00

Факс: (495) 718-34-04

e-mail: dir@ispm.ru

ИНН 7728021249 ОГРН 1037739764171 ОКПО 02699257

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Института
синтетических полимерных
материалов им. Н. С. Ениколопова
Российской академии наук
д.х.н., член-корр. РАН
Пономаренко С.А.



“23” мая 2023 г.

24.05.2023 № 12114-02 2115 /211

на № _____

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова
Российской академии наук на диссертационную работу Садыковой Ольги
Витальевны «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.

Прогрессирующий рост устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам, который наблюдается в последние годы, приобретает все более серьезный характер и приводит к невозможности использования целых групп таких препаратов для лечения инфекций, вызванных устойчивыми штаммами микроорганизмов. Альтернативой лечению локализованных инфекций антибиотиками может стать формирующееся в последние годы новое направление фотодинамической терапии – антибактериальная фотодинамическая терапия (АФДТ), или фотодинамическая инактивация бактерий, грибов, вирусов. В настоящее время АФДТ уже используют при лечении острых и хронических воспалительных процессов в отоларингологии, стоматологии, хирургии (при лечении гнойных ран), в комбустиологии (при лечении осложненных ожогов), гастроэнтерологии.

В основе АФДТ лежат цитотоксические свойства активных форм кислорода (АФК), прежде всего синглетного $^1\text{O}_2$ кислорода, генерируемых

фотосенсибилизаторами (ФС) в возбужденном состоянии. Важным преимуществом АФДТ является многовариантность характера окислительной деструкции микробных клеток-мишеней, что препятствует выработке устойчивости организма к последующим циклам фотодинамических воздействий. Для повышения эффективности АФДТ при воздействии на длительно незаживающие раны ФС используют в составе макромолекулярных конъюгатов – при ковалентном (или нековалентном, в частности, координационном) связывании ФС с фрагментами биомолекул (антител, аминокислот, липосом, полипептидов, имеющих сродство к определенным молекулам-мишеням), способствующих проникновению фотосенсибилизатора в клетку.

Однако использование ФС систем, содержащих фрагменты биологически-активных макромолекул, имеет ограничения, которые связаны не только со сложностью воспроизводимого синтеза таких систем в силу неизбежного биоразнообразия используемых фрагментов, но и с высокой стоимостью таких препаратов, что ограничивает возможности их широкого применения в медицине. Проблема возникает и в связи с чисто научными аспектами – трудностями модельного исследования механизмов ФС процессов, что значительно затрудняет целенаправленный поиск новых функционально ориентированных ФС систем.

Основные перспективы создания новых ФС систем связываются с поисками полимерсодержащих ФС систем. Разнообразие существующих типов водорастворимых полимеров, возможность контроля их молекулярно-массового распределения, а также разной степени гидрофобности и плотности зарядов открывают широкие возможности формирования свойств, функционально значимых для растворения и распределения ФС систем в патологических тканях разного генезиса, что может определять и специфику кинетики инициируемых *in vivo* фотосенсибилизированных процессов при соответствующей локализации ФС.

Следует отметить, что, несмотря на важность таких систем для повышения эффективности и избирательности антибактериальной фотодинамической терапии, в литературе очень мало соответствующих исследований, если иметь в виду физико-химические аспекты использования высокомолекулярных соединений. В связи с этим диссертационная работа Садыковой О.В., посвященная установлению механизмов процессов фотогенерации синглетного кислорода, происходящих с участием полимерных фотосенсибилизирующих систем на основе порфиринов, амфифильных полимеров и биологически активных соединений на эффективность фотогенерации 1O_2 , (в модельной реакции фотоокисления триптофана), является актуальной. В качестве ФС в работе были выбраны порфирины различной природы: водорастворимые – диметилглутаминовая соль хлорина еб (препарат «Фотодитазин», ФД, используемый в клинической практике ФДТ) и тринатриевая соль хлорина еб ($ХебNa_3$, аналог препарата «Фотодитазин»), а также гидрофобный пентафторфенилпорфирин (ТФПФ20), обладающий

высоким квантовым выходом фотогенерации синглетного кислорода. В качестве амфифильных полимеров использовались хорошо изученные и применяемые в настоящее время в медицине поли-N-винилпирролидон (ПВП) и плуроник F127. Присутствие полисахарида – альгината натрия (АН), обладающего ранозаживляющими свойствами, в разрабатываемой полимер-полимерной ФС-системе с одновременным воздействием биологически активного соединения – динитрозильного комплекса железа (ДНКЖ), способного выступать в биосистемах в качестве доноров монооксида азота (NO) – стимулятора репарационно-регенеративных (восстановительных) процессов в живых организмах, позволяет эффективно использовать указанные системы при АФДТ локальных инфекций. Это было продемонстрировано, как указано в диссертации, при использовании разработанных ФС-композиций при ФДТ модельных ран у лабораторных животных.

В качестве наиболее значимых результатов можно выделить следующие:

1. Установлены факторы, определяющие характер взаимодействия используемых полимерных систем и низкомолекулярных компонентов (ФС молекулы) в формируемых 2-х, 3-х и 4-х компонентных ФС системах. В частности, методами ^1H ЯМР спектроскопии, рентгеновской дифракцией (РД), атомно-силовой микроскопией (АСМ) и термогравиметрического анализа (ТГА) подтверждено, что в водных растворах, содержащих исследуемые фотосенсибилизирующие полимерные системы, и в твердых пленках, формируемых при испарении данных растворов, ХебНа взаимодействует с ПВП и не взаимодействует с АН. При этом, методами динамического рассеяния света (ДРС), РД и АСМ показано, что полимерные компоненты – АН и ПВП не взаимодействуют друг с другом, как в растворах, так и в твердых пленках, полученных при испарении водных растворов, содержащих указанные компоненты.

2. Экспериментально установлено, что АН не влияет на фотокаталитическую активность ХебНа и ФД в фотогенерации $^1\text{O}_2$ в модельной реакции фотоокисления триптофана. Впервые показано, что ПВП предотвращает разрушающее воздействие, оказываемое со стороны активных радикалов NO^\bullet , образующихся при фоторазложении ДНКЖ, на молекулы ФД. При этом, АН, не влияя на фотокаталитическую активность системы ФД – ПВП и ДНКЖ, оказывает *in vivo* на раневую поверхность животных заживляющее действие в сеансах АФДТ. Показано, что гидрофобный порфирин – ТФПФ20, солюбилизированный плуроником F127, обладает высокой фотокаталитической активностью в водной фазе в присутствии как ДНКЖ, так и АН.

3. Проведенные доклинические исследования на модельных ранах у лабораторных животных показали возможность использования композиции на основе ФД – ПВП – АН – ДНКЖ в качестве альтернативы используемым в настоящее время ФС для лечения локальных инфекций методом ФДТ.

Полученные результаты представляются крайне важными и актуальными. Создаваемые в данной работе композиции на основе комплексов ФД с ПВП,

полисахарида – АН и ДНКЖ с природным тиолсодержащим лигандом – глутатионом позволят не только разработать комплексный подход к лечению ран методом ФДТ, но и выработать новую стратегию в терапии поверхностных поражений кожи разного генеза.

Структура и содержание диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав (литературный обзор, методическая часть и 3 главы, содержащие результаты исследований и их обсуждение), заключения, списка сокращений и списка цитируемой литературы. Диссертационная работа изложена на 132 страницах, содержит 56 рисунков и 11 таблиц.

Во **введении** раскрывается актуальность и научная новизна работы, определяются цель и основные задачи исследования, перечисляются основные положения, выносимые на защиту.

Первая глава содержит обзор литературы. Рассмотрен ряд фотосенсибилизаторов и препаратов на их основе, которые в настоящее время используются в медицинской практике, как при лечении онкологических заболеваний с применением метода ФДТ, так и при лечении локальных инфекций, вызванных антибиотикорезистентными штаммами микроорганизмов. Представлено современное состояние вопроса создания новых лекарственных препаратов, способных повысить эффективность метода АФДТ. В частности, использования ФС в комплексах с АП – ПВП, плюронином F127. Описана общая характеристика ПВП и плюроника F127, представлена структура и основные свойства АН и ДНКЖ.

Во **второй** главе описаны объекты и методы исследования. Автор широко применяет спектральные методы исследования, а также методы оценки надмолекулярной структуры полимерных порфиринсодержащих систем в растворах и пленках (рентгеновская дифракция, АСМ, ТГА, светорассеяние).

В **третьей** главе представлены кинетические данные о влиянии альгината натрия и поливинилпирролидона на фотокаталитическую активность диглутаминовой и тринатриевой соли хлорина еб в реакции фотоокисления триптофана. Были получены зависимости эффективной константы скорости реакции фотоокисления триптофана в присутствии двойных ХебNa – АН, ФД – АН, ХебNa – ПВП и тройной ХебNa – ПВП – АН систем от концентрации ПВП и АН, соотношения полимерных компонентов в системе и природы ФС. Было показано, что повышение фотокаталитической активности системы ХебNa – АН в присутствии АП – ПВП связано с взаимодействием между группировками ХебNa и ПВП и агрегацией исходно ассоциированных молекул ХебNa. При этом, присутствие АН не влияет на активность системы ХебNa – ПВП, тем самым, не препятствуя образованию комплекса между ХебNa и ПВП. О взаимодействии между группировками ХебNa и ПВП в системах ХебNa – ПВП и ХебNa – ПВП – АН и об их отсутствии между ХебNa и АН в системе ХебNa – АН и соответствующей трехкомпонентной системе свидетельствуют спектральные данные, в частности, исследование электронных спектров поглощения, спектров флуоресценции и ¹Н ЯМР спектров, полученных фотосенсибилизирующих полимерных систем. Методом динамического

рассеяния света (ДРС) показано отсутствие взаимодействий между ПВП и АН в смеси ПВП – АН.

Четвертая глава посвящена исследованию особенностей взаимодействия ХебНа и полимеров в многокомпонентных фотокаталитических системах. Методами рентгеновской дифракции, АСМ и ТГА было проведено исследование структуры твердых пленок, полученных из водных растворов ХебНа, АН и ПВП при разных пропорциях этих составляющих. Методами РД и АСМ показано, что АН и ПВП в пленках, полученных при испарении водных растворов, содержащих системы ХебНа – ПВП – АН, не образуют общей фазы, при этом ХебНа преимущественно локализуется в мелкодисперсном виде в фазе ПВП. Методом ТГА показано, что в присутствии ХебНа меняется механизм термодеструкции ПВП. Такой эффект может свидетельствовать о взаимодействии ХебНа с поливинилпирролидоном. При этом в системе ХебНа – АН практически не наблюдается изменений в характере кривых ТГ и ДСК, что указывает на отсутствие взаимодействия между ХебНа и АН.

Пятая глава посвящена вопросу установления возможностей совмещения фотодинамических воздействий на патологические ткани и одновременного фотоинициирования в этих тканях регуляторно-регенеративных процессов со стороны радикалов NO^\bullet , генерируемых при разложении ДНКЖ. Сложность достижения таких решений была связана с тем, что в условиях фотовозбуждения оба процесса – ФДТ и ДНКЖ-разложение – направлены на подавление активности друг друга. В частности, было показано, что в присутствии ДНКЖ фотокаталитическая активность фотодитазина снижалась, что было связано с фотодеструкцией молекул ФД, вызванной взаимодействием молекул ФД с радикалами NO^\bullet . Одно из возможных решений этой проблемы заключалось в использовании амфифильного полимера – ПВП в системах ФД – ДНКЖ. В работе Садыковой О.В. впервые показано, что ПВП способен нивелировать разрушающее воздействие, оказываемое со стороны активных радикалов NO^\bullet , на молекулы фотодитазина. Негативного разрушающего воздействия, оказываемого со стороны радикалов NO^\bullet на порфирин, удалось также избежать благодаря «инкапсуляции» гидрофобного – пентафторфенилпорфирина (ТФПФ20) в мицеллах плюроники F127. Следует отметить, что присутствие АН не влияло на фотокаталитические свойства систем фотодитазин – ПВП и ТФПФ20 – F127 в присутствии ДНКЖ.

Теоретическая и практическая значимость проведенных автором исследований заключается в разработке и экспериментальном подтверждении возможности использования комплекса ФД – ПВП в присутствии АН и ДНКЖ в качестве возможной лекарственной композиции при лечении локальных инфекций с использованием метода ФДТ. Кроме того, было проведено исследование данной композиции на модельных ранах лабораторных животных. Было показано, что добавление ПВП, АН и ДНКЖ в раствор фотодитазина значительно уменьшает геморрагический эффект ФДТ, обычно характерный для этого метода и затрудняющий кровоток в ране. На основании результатов гистологических исследований, было показано, что при процедурах

ФДТ с применением композиции ФД – ПВП – АН – ДНКЖ в большей мере достигаются пролиферация фибробластов, рост и созревание грануляционной ткани, а также васкуляризация раневых тканей. Это в определенной степени связано с наличием ДНКЖ в составе композиций, и соответствует данным о стимулирующем влиянии ДНКЖ на пролиферацию фибробластов и рост грануляционной ткани.

Полученные результаты полностью отражены в 5 публикациях в российских и международных изданиях, входящих в перечень ВАК. Материалы диссертации прошли апробацию на всероссийских и международных конференциях. Автореферат диссертации достаточно полно отражает основное содержание диссертации.

Работа выполнена на хорошем научном и методическом уровне автором диссертации самостоятельно. Результаты работы наряду с очевидной научной новизной имеют практическую направленность.

По содержанию диссертационной работы можно высказать следующие замечания:

1. Остается неясным, насколько величина рН растворов, исследуемых фотосенсибилизирующих полимерных систем, является параметром ключевым, и какое конкретно значение рН реализовывалось при формировании каждой из полученных систем. Вопрос связан с тем, что в литературном обзоре подробно охарактеризованы вязкостные характеристики альгината натрия (АН) и значения рН, при которых альгинат ведет себя по-разному. Но к этим вопросам в последующем соискатель не возвращался.
2. В главе 3 представлены исследования смеси ПВП с АН методом динамического рассеяния света в солевом растворе. Проводились ли кинетические исследования полученных фотосенсибилизирующих полимерных систем в таких растворах?
3. В главе 5 приведены спектры люминесценции синглетного кислорода для чистого фотодитазина и в присутствии ДНКЖ, но не приведены для системы ФД – ДНКЖ в присутствии ПВП и АН. Хотелось бы понять, влияние двух полимеров (ПВП и АН) на фотогенерацию синглетного кислорода в смеси ФД с ДНКЖ.
4. В спектрах люминесценции, приведенных на рисунке 49 для ФД и ФД в присутствии ДНКЖ, интенсивность люминесценции синглетного кислорода падает на ~ 25-30%. При этом, в модельных условиях при фотоокислении триптофана такого сильного падения не наблюдается.
5. В диссертационной работе желательно было бы более полно охарактеризовать комплексы, оценить параметры комплексообразования.

Заключение

Приведенные замечания не снижают высокую научную и практическую значимость диссертационной работы О.В. Садыковой, в которой проведены экспериментальные исследования полученных фотосенсибилизирующих


полимерных систем как *in vitro* (в модельных условиях фотоокисления триптофана), так и *in vivo* (на модельных ранах лабораторных животных).

Диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года, и «Изменений, которые вносятся в Положение о присуждении ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства Российской Федерации №335 от 21 апреля 2016 года. Представленная диссертация является законченной научно-квалифицированной работой, в которой разработаны порфиринсодержащие полимерные фотосенсибилизирующие композиции для АФДТ на основе амфифильных полимеров, альгината натрия и ДНКЖ и установлено влияние состава и соотношения компонентов разработанных систем на их функциональную активность.

Автор диссертации Садыкова Ольга Витальевна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.7 – высокомолекулярные соединения.

Отзыв рассмотрен и одобрен на расширенном семинаре отдела биополимеров ИСПМ им. Н.С. Ениколопова РАН 04 мая 2023 г. Присутствовало 7 докторов и 10 кандидатов наук, работающих в области синтеза, изучения структуры полимеров и их физико-химических свойств (протокол №02-2023).

Старший научный сотрудник лаборатории твердофазных химических реакций ИСПМ РАН, доктор химических наук по специальности 1.4.7 – высокомолекулярные соединения

 / Т.С. Демина
23.05.2023

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова
Российской академии наук (ИСПМ РАН)
117393, Российская Федерация, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 70
Тел.: +7-495-332-58-27, +7-495-335-91-00
e-mail: getmanova@ispm.ru



ВЕРНО НАЧАЛЬНИК
ОТДЕЛА КАДРОВ ИСПМ РАН

