ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Беляевой Елизаветы Викторовны на тему «Производные порфиринов, растворимые во фторуглеродах, как фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии рака», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – Органическая химия

Фотодинамическая терапия представляет собой чрезвычайно эффективный и безопасный способ лечения поверхностных опухолей и раневых инфекций. Основное преимущество фотодинамической терапии перед химиотерапевтическими подходами состоит в почти полном отсутствии тяжелых осложнений, связанных с подавлением иммунитета и общим отравлением организма, которые наблюдаются при использовании цитостатических лекарств, по существу, представляющих собой яды, убивающие любые быстро делящиеся клетки. Однако, несмотря на большие преимущества, данный подход имеет целый ряд серьезных ограничений, к которым, в первую очередь, относится низкая прозрачность тканей в диапазоне длин волн, относящихся к видимому свету.

В процессах, происходящих в ходе фотодинамической терапии три основных участника: свет, фотосенсибилизатор и кислород, содержащийся в растворе, омывающем клетки. Для повышения эффективности данного подхода требуется создать такой фотосенсибилизатор, чтобы он имел интенсивную полосу поглощения в области 600-1200 нм. Кроме того, необходимо добиться того, чтобы фотосенсибилизатор был бы плохим субстратом для синглетного кислорода. Наконец, необходимо создать достаточно высокую концентрацию кислорода вблизи опухолевых клеток. Последнее обстоятельство особенно актуально в связи с тем, что беспорядочный и быстрый рост некоторых опухолей приводит к тому, что опухолевые ткани недостаточно снабжаются кровью, а значит, и кислородом. В этих случаях фотодинамическая терапия оказывается неэффективной. В литературе имеются сообщения, что даже помещение пациента в барокамеру с повышенным содержанием кислорода не позволяет добиться требуемой эффективности фотолечения.

В рецензируемой работе предлагаются подходы для решения всех трех отмеченных проблем, возникающих при использовании фотодинамической терапии. И все эти проблемы оказывается возможным решить с помощью использования фторсодержащих порфиринов. Так, фторзамещенные порфирины обладали относительно высокими коэффициентами экстинкции в области 660-720 нм, квантовые выходы генерации синглетного кислорода составляли для некоторых из полученных производных 80-90%, и значительное количество фтора, вводимое в порфириновую молекулу (до 82 в одном из синтезированных производных), обеспечивали им хорошую растворимость в перфтордекалине. Поэтому огромная работа, проделанная диссертантом в ходе выполнения исследования, является чрезвычайно актуальной.

Работа построена по традиционной схеме. Обзор литературы состоит из трех основных частей, причем первые две, посвященные общим принципам фотодинамической терапии и особенностям фторсодержащих порфириноидов, написаны достаточно лапидарно, что вполне оправдано, поскольку их функция состоит лишь в том, чтобы разъяснить некоторые базовые понятия, используемые в работе. При этом третья часть обзора литературы, посвященная синтезу фтор-содержащих порфиринов, написана чрезвычайно подробно, и дает панораму многочисленных подходов к синтезу фторсодержащих порфиринов, описанных в литературе. Материал четко систематизирован по стратегиям синтеза. Такая структура обзора литературы показывает осмысленность выбора подходов к синтезу порфиринов, использованных диссертантом.

Главу, посвященную обсуждению результатов работы, автор начинает с дизайна синтезируемых порфиринов. В литературе обсуждаются две основных стратегии синтеза порфиринов, содержащих атомы фтора в порфириновом цикле. Одна из них сводится к конденсации фторсодержащих пирролил-2-карбинолов и приводит порфиринам, содержащим перфторалкилные радикалы в мезо-положениях. Другая стратегия, заключающаяся в алкоксилировании мезо-тетракис-(пентафторфенил)порфирина полифторалифатическими спиртами, приводит к производным, в которых перфторалкильные радикалы присоединены к перфторфенильным группам, также находящимся в мезо-положениях порфирина. При этом пути, приводящие к порфиринам, в которых фторалкильные радикалы присоединены к пиррольным циклам, в работе не рассматривались.

В работе было синтезировано 10 новых порфириновых структур, содержащих большое количество атомов фтора, причем в наиболее обогащенном фтором порфирине содержалось 84 атома фтора. Такое большое содержание фтора в порфириновой молекуле должно было обеспечить растворимость порфиринов во фторуглеродных растворителях. С другой стороны, наличие электроноакцепторного фторсодержащего заместителя в мезо-положении порфирина должно обеспечивать высокую стабильность порфирина по отношению к окислению, в том числе синглетным кислородом. Наконец, наличие электроноакцепторных, ароматических или виниловых заместителей в мезо-положении может смещать длины волн электронных переходов в область ближнего ИК-диапазона.

Диссертантом была также проделана большая и очень важная работа по подбору способа синтеза фторсодержащего хлорина, т.е. порфириноида, в котором двойная связь в одном из пиррольных циклов превращена в одинарную. Интерес к соединениям этого типа обусловлен дополнительным сдвигом полосы поглощения в длинноволновую область за счет модификации цепи сопряжения в порфириновом цикле. Автором было исследовано пять различных путей превращения порфирина в хлорин и лишь один из них, окисление тетраоксидом осмия привел к желаемому хлорину. К сожалению, автор не изучил в дальнейшем свойства полученного хлорина, однако разработанный в данной диссертации путь синтеза фторсодержащего хлорина представляет большой интерес для дальнейшего развития данной работы.

В последующих частях работы, посвященных исследованию свойств полученных фторсодержащих порфиринов, основное внимание было сфокусировано лишь на трех производных, одно из которых (3c) содержало 4 додекафторгексильных радикала в мезо-положениях порфирина, второе (4a) – четыре 2,3,5,6-тетрафтор-(додекафторгексилокси)фенильных радикала и третье (8) –четыре перфтор-(2-метил-3-изопропилпентенокси)-фенильные группы.

Главная цель работы состояла в получении порфириновых фотосенсибилизаторов, способных растворяться во фторуглеродах. Оказалось, что все три выбранных производных растворялись в перфтордекалине в концентрации около 1 мМ. Следует отметить, что это очень высокая растворимость для порфиринов. Очевидно, что этот

впечатляющий результат является следствием очень высокого содержания фтора в данных соединениях (от 48 до 68 атомов на молекулу).

Полоса Соре в спектре поглощения всех фторированных порфиринов немного сдвинута в красную область спектра по сравнению с обычными симметричными порфиринами. Однако при этом порфирин с додекафторгексильными радикалами имел довольно существенный пик поглощения в области около 650 нм в растворе в перфтордекалине. Это означает, что такой порфирин можно применять в ФДТ, поскольку он поглощает в области спектра, соответствующей окну прозрачности биологических тканей. Интересно, что в спектрах производных мезо-тетракис-(пентафторфененил)порфирина соответствующая полоса поглощения выражена в меньшей степени.

Прямое исследование генерации синглетного кислорода фторсодержащими порфиринами показало их высокую фотокаталитическую активность. Квантовые выходы генерации синглетного кислорода определены вполне корректно с помощью прямого измерения фосфоресценции синглетного кислорода при 1270 нм.

Многообещающие результаты получены в работе при исследовании фототоксичности фторсодержащих порфиринов, включенных в состав фторуглеродной эмульсии на основе перфтордекалина. Оказалось, что включение фторсодержащих порфиринов в состав фторуглеродных эмульсий не влияет на их токсичность в отсутствие освещения, однако существенно усиливает их фототоксическое действие на клетки. Кроме того, методом магниторезонансной томографии автором продемонстрирована возможность выведения фторуглеродных эмульсий из организма, что открывает перспективы их использования для терапии гипоксических опухолей.

В то же время при прочтении работы возникают некоторые вопросы и замечания..

1) При замещении атома фтора в 4-фторбензальдегиде реакцию с алкоголятом фторсодержащего спирта проводили в ДМСО, который настолько гигроскопичен, что остается сухим только в инертной атмосфере, либо в ДМФА, который не столь гигроскопичен, но способен сам вступать в реакции с такими сильными нуклеофилами, как алкоголяты. Была также сделана совершенно разумная попытка заменить эти растворители на ТГФ, но вследствие низкой температуры кипения, такие условия не

позволили провести реакцию при достаточно высокой температуре. Не очень понятно, почему в этой ситуации автор не воспользовался диоксаном или диглимом.

2) Представленные в работе данные измерения фототоксичности не содержат доверительных информации о статистической обработке полученных данных. Эта информация очень желательна при интерпретации данных о фототоксичности.

3) При исследовании фототоксичности фторсодержащих порфиринов в составе фторуглеродных эмульсий делается вывод о дополнительной оксигенации опухолей растворенным в перфтордекалине кислородом. Этот вывод делается на основании того, что фототоксичность порфирина в составе фторуглеродной эмульсии была приблизительно вдвое выше, чем фототоксичность порфирина, добавляемого в среду в виде раствора в ДМФА. Полученные в работе различия могут быть следствием не повышения содержания кислорода в среде, вызванном добавлением фторуглеродной эмульсии, а изменением состояния фотосенсибилизатора. Известно, что при добавлении в клеточную среду все порфирины и хлорины прочно связываются с сывороточными белками и попадают в клетки в составе таких комплексов. Основными компонентами сыворотки, связывающими порфирины являются альбумин и липопротеиды высокой и низкой плотности (в англоязычной литературе –HighDensityLipoprotein–HDL, и LowDensityLipoprotein – LDL). Данные белки и липопротеиды легко окисляются, поэтому именно эти белки и принимают на себя существенные количества генерируемого синглетного кислорода. Включение порфиринов в состав мицелл плюроника, комплексов с другими амфифильными сополимерами, поливинилпирролидоном и т.д. увеличивает их фототоксичность по нашим и литературным данным в 7-10 раз. Это, по всей видимости, связано с тем, что такие сополимеры гораздо хуже окисляются синглетным кислородом, чем белки и липиды, поэтому токсическое воздействие синглетного кислорода оказывается значительно выше. В состав фторуглеродной эмульсии, использованной в данной работе, входил полоксамер, который проявляет высокое сродство к порфиринам. Для того, чтобы отличить эффект полоксамера от эффекта перфтордекалина, в клеточных экспериментах должен был быть поставлен контрольный опыт, в котором порфирин включался бы в состав раствора, содержащего все компоненты, кроме перфтордекалина. К сожалению, такого контроля поставлено не было.

По актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований и практической значимости диссертационная работа Е.В. Беляевой удовлетворяет всем критериям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автореферат полностью отражает содержание диссертации, и все основные результаты опубликованы в рецензируемых журналах из перечня изданий, рекомендованных ВАК. У меня нет сомнений, что Е.В. Беляева заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – Органическая химия.

Официальный оппонент
ведущий научный сотрудник лаборатории
функциональных полимеров и полимерных материалов
кафедры высокомолекулярных соединений
доктор химических наук Мелик-Нубаров Николай Сергеевич

Подпись Мелик-Нубарова Николая Сергеевича заверяю
декан Химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова,
академик В.В. Лунин

Дата 19 января 2018 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» Химический факультет, кафедра высокомолекулярных соединений.

119991, Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В.Ломоносова, д. 1, стр. 40, Лабораторный корпус «А»

Тел.:/факс:+7 (495) 9393127/ +7(496)9390174
e-mail: melik.nubarov@genebee.msu.ru