

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Шилягиной Натальи Юрьевны на тему «Исследование тетраарилтетрацианопорфиразинов в качестве потенциальных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики», представленную к защите в диссертационный совет Д.212.038.03 при Воронежском государственном университете на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Фотодинамическая терапия опухолей (ФДТ) – интенсивно развивающееся в последнее время комплексное направление исследований, в котором решаются как биофизические проблемы, так и задачи смежных наук – фотобиологии, клеточной биологии, онкологии и фармакологии. В ФДТ фотовозбуждение молекул красителей-фотосенсибилизаторов приводит к окислительному стрессу и смерти злокачественных клеток. Кроме того, по флуоресценции фотосенсибилизаторов можно визуализировать опухоль, точнее определить ее границы для того, чтобы хирург мог увидеть и удалить, тонкие веточки опухоли, которые могут дать повторный рост. Хотя с 1970-х годов ФДТ успешно применяется для лечения ряда опухолей, пока не найден оптимальный фотосенсибилизатор, удовлетворяющий всем противоречивым требованиям. Видимо, для лечения разных видов рака должны применяться различные фотосенсибилизаторы. Их разработка ведется во многих лабораториях мира. Некоторые вещества уже апробированы и используются в клиниках, но полное решение этой задачи еще впереди. Важной проблемой современной медицины является направленная доставка лекарственных препаратов, в данном случае фотосенсибилизаторов к опухоли. Одним из подходов к ее решению является использование носителей - полимерных наночастиц.

Диссертация Шилягиной Н.Ю. посвящена актуальной проблеме – разработке новых фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики рака. Автором поставлена задача исследовать новый класс фотосенсибилизаторов – тетраарилтетрацианопорфиразинов, ранее не применявшихся в ФДТ. Были изучены два тетраарилтетрацианопорфиразина и два их итербиевых производных, причем для доставки этих фотосенсибилизаторов к опухолям были изучены также их комплексы с 4 типами полимерных наночастиц. В работе проведено полное исследование этой проблемы на разных уровнях организации – молекулярном, клеточном и организменном и продемонстрирована высокая фотодинамическая эффективность комплексов тетраарилтетрацианопорфиразинов с некоторыми полимерными. Эта работа важна и актуальна.

В первой главе диссертации автором дан подробный обзор основных существующих фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики опухолей. Рассмотрены их физико-химические характеристики, определяющие фотодинамическую эффективность и внутриклеточное распределение. После этого приведены данные о тетраарилтетрацианопорфиринах и флуоресцентных молекулярных роторах, которые могут служить потенциальными сенсорами локальной вязкости в химических и биологических системах, таких как биомембраны, белки, элементы цитоскелета и др. Список цитируемых источников весьма обширен – 270 книг и статей.

Во второй главе диссертации описаны методы, использованные автором в своем исследовании. Следует отметить большое количество современных и разнообразных исследовательских методов, использованных Н.Ю. Шилягиной для изучения 4 тетраарилтетрацианопорфиринов и их комплексов с 4 полимерными наночастицами: спектрофотометрический и спектрофлуоресцентный анализ с определением квантового выхода флуоресценции, определение времени жизни возбужденных состояний молекул с помощью время-разрешенной лазерной спектроскопии, определение гидрофобности исследуемых веществ по распределению в системе «октанол-вода», определение квантового выхода синглетного кислорода путем измерения его фосфоресценции с помощью время-разрешенной спектроскопии в инфракрасном диапазоне (1270 нм), методы культуры клеток (5 линий), изучение динамики накопления флуорофоров на планшетном спектрофотометре-спектрофлуориметре, изучение поглощения и накопления тетраарилтетрацианопорфиринов с помощью лазерной конфокальной микроскопии, использование клеток, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок, слитый с митохондриальным цитохромом С или ядерным ламином, МТТ-тест для определения выживаемости клеток, время-разрешенная микроскопия клеток (FLIM), анализ фотодинамической активности тетраарилтетрацианопорфиринов, для чего был разработан специальный светодиодный излучатель, поверхностный флуоресцентный имиджинг тканей экспериментальных животных с привитыми опухолями для оценки распределения исследуемых веществ в опухоли и окружающих нормальных тканях, микроскопическое исследование накопления тетраарилтетрацианопорфиринов в тканях животных. Этот впечатляющий перечень методов, характерный скорее для докторской, чем для кандидатской диссертации, свидетельствует о большом объеме исследований, проведенных на самом современном методическом уровне. Статистические методы обработки результатов экспериментов адекватны.

Н.Ю. Шилягиной получено много новых интересных и важных научных данных о физико-химических характеристиках тетраарилтетрацианопорфиринов, их

внутриклеточной локализации, фотодинамической эффективности на клеточном уровне и в организме больных раком мышей. Автором детально охарактеризованы основные фотофизические свойства тетраарилтетрацианопорфиразинов, включая их спектры поглощения и флуоресценции, как в растворах, так и в составе полимерных наночастиц, оценена их гидрофобность, которая имеет важное значение для внутриклеточного распределения и фармакокинетики, показано, как включение данных красителей в полимерные наночастицы влияет на эти свойства. Автором впервые показано, что тетраарилтетрацианопорфиразины обладают свойствами молекулярных роторов, флуоресценция которых зависит от микроокружения. При этом было показано, что в присутствии белков сыворотки крови, особенно, альбуминов времена жизни возбужденного состояния и квантовый выход флуоресценции сильно увеличиваются. Автор связывает это явление с повышением вязкости микроокружения флуорофора, что позволяет использовать его в качестве сенсоров вязкости различных сред.

В другой серии опытов Н.Ю. Шилягина изучила накопление и внутриклеточную локализацию тетраарилтетрацианопорфиразинов. Было показано, что они быстро накапливаются опухолевыми клетками, причем полимерное микроокружение сильно влияет на этот процесс. Наилучшие результаты были достигнуты с использованием, так называемых, полимерных щеток в качестве носителей этих фотосенсибилизаторов. Интересной оказалась и внутриклеточная локализация красителей: они концентрировались в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, но при этом не попадали в митохондрии. Особенно интересной оказалась их способность окрашивать ядерную оболочку.

Весьма интересны эксперименты автора по изучению фотосенсибилизированных клеток методом время-разрешенной флуоресцентной микроскопии, но, к сожалению, автор не дает подробной трактовки результатов экспериментов: о чем они говорят, как связать полученные данные с изменениями функционального состояния клеток и с процессом их гибели.

Изучение фотодинамического действия тетраарилтетрацианопорфиразинов на культивируемые раковые клетки, показало, что фототоксическое действие безметаллических тетраарилтетрацианопорфиразинов сравнимо с фототоксичностью известных фотосенсибилизаторов Фотосенса и Фотодитазина. Итербиевые производные тетраарилтетрацианопорфиразинов, однако, такой способностью не отличались, но они могли использоваться для диагностики.

В исследованиях на животных Н.Ю. Шилягиной было продемонстрированное быстрое и селективное накопление тетраарилтетрацианопорфиразинов в

экспериментальных опухолях у мышей уже через 30 минут и особенно через 3-6 часов после инъекции. Это важное достоинство тетраарилтетрацианопорфиразинов как фотосенсибилизаторов, позволяющее визуализировать опухоль, определить оптимальное время фотодинамической терапии и, если одной фотодинамической терапии недостаточно, проводить ее хирургическую резекцию в контролируемых условиях. Важным свойством данных препаратов также является быстрое выведение красителя из организма: уже через сутки после инъекции в тканях мышей оставались только следовые количества тетраарилтетрацианопорфиразинов. На практике это означает, что процедуры фотодинамической терапии можно проводить в амбулаторных условиях и избежать длительной фотосенсибилизации (до 2 месяцев) организма пациентов, как в случае многих превосходных фотосенсибилизаторов, таких как Фотосенс, не нашедших из-за этого практического применения.

Таким образом в работе Н.Ю. Шилягиной проведено полное и детальное исследование физико-химических свойств и фотодинамической эффективности тетраарилтетрацианопорфиразинов. Автором получено много новых важных данных, которые, с одной стороны, вносят существенный вклад в фотохимию, фотобиологию и онкологию. Эти данные достоверны, они создают теоретические основы для последующего практического применения тетраарилтетрацианопорфиразинов в качестве флуорофоров и фотосенсибилизаторов для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии рака.

Полученные автором результаты рожают, однако, множество вопросов, например, таких как:

- Почему введение иттербия, не влияя на спектры поглощения тетраарилтетрацианопорфиразинов, сдвигает их спектры флуоресценции? (рис.11 и 12)
- Почему иттербий повышает гидрофильность этих фотосенсибилизаторов? (Табл.4)
- Почему заключение тетраарилтетрацианопорфиразинов в полимерные носители также сдвигает их спектры? (Рис.11 и 13)
- Почему именно полимерные щетки явились наиболее эффективным носителем тетраарилтетрацианопорфиразинов среди других полимеров? (Табл.5)
- Каков механизм накопления тетраарилтетрацианопорфиразинов в ядерной оболочке? (Рис.23)
- Почему тетраарилтетрацианопорфиразины не окрашивают митохондрии и плазматическую мембрану? (Рис.23)

Это только примеры множества вопросов, возникающих при рассмотрении результатов работы. Но именно наличие таких вопросов отличает настоящую научную

работу, которая не закрывает проблему, а открывает широкое поле для развития данного направления, углубления полученных знаний и постановки последующих экспериментов.

К недочетам данной диссертации можно отнести чрезмерную лаконичность описания некоторых экспериментов и трактовки полученных результатов. Это следует учесть при подготовке статей.

Неясным нам представляется предположение автора, что в клетках фотосенсибилизатор выходит из наночастиц полимерных щеток (с.75). Неясно, каким может быть механизм выхода и последующего перераспределения красителя. Также в работе не приведены размеры наночастиц.

По нашему мнению в выводы данной работы и формулировку ее научной новизны не следовало включать разработку светодиодного излучателя, что само по себе является важным методическим приемом, но отражающим суть работы. Тут следовало бы обратить больше внимания на полученные фундаментальные данные о фотофизических и фотохимических свойствах тетраарилтетрацианопорфиразинов, их взаимодействиях с клетками и организмом животного.


Несмотря на отдельные недочеты надо подчеркнуть новизну и фундаментальный характер работы Н.Ю. Шилягиной, его многосторонность, полноту исследования тетраарилтетрацианопорфиразинов как нового класса фотосенсибилизаторов, включающего изучение фотофизических и фотохимических процессов, цитологических аспектов взаимодействия данных веществ с клетками и процессов накопления фотосенсибилизаторов в опухолях. Эти данные являются новыми и обладают высокой теоретической и практической значимостью.

Полученные данные найдут применение при разработке методов фотодинамической терапии и диагностики с участием тетраарилтетрацианопорфиразинов. Предстоит большая работа совместно с онкологами по определению круга опухолей, для которых эти фотосенсибилизаторы окажутся наиболее эффективными. Использование наночастиц из полимерных щеток в качестве носителей для направленной доставки фотосенсибилизаторов не только этого класса, а и других – еще одно направление исследований и возможная область практического применения. Организации, заинтересованные в результатах таких работ, - это онкологические институты, в первую очередь, Онкологический центр им. акад. Блохина (Москва), Онкологический институт им. Герцена (Москва), Институт биомедицинской химии РАН (Москва). Также данные, полученные Н.Ю. Шилягиной, войдут в учебные курсы по фотохимии, фотомедицине и фотобиологии.

Диссертация прекрасно проиллюстрирована (45 илл. и 7 таблиц). Автореферат соответствует основному содержанию диссертации. Полученные данные апробированы на 17 российских и международных конференциях и опубликованы в 3 журналах, цитируемых в базе данных Scopus, и 1 журнале, входящем в список ВАК.

Учитывая актуальность выбранной автором тематики, применение разнообразных экспериментальных методов, новизну, теоретическую и практическую важность и достоверность полученных результатов, я считаю, что диссертационная работа Натальи Юрьевны Шилягиной на тему «Исследование тетраарилтетрацианопорфиразинов в качестве потенциальных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика, является законченной фундаментальной работой, соответствующей требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям (Положение о порядке присуждения ученых степеней, утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г.), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Доктор биологических наук,
профессор кафедры биофизики и биокibernетики,
главный научный сотрудник
Академии биологии и биотехнологии
Южного федерального университета


А.Б. Узденский

Подпись А.Б. Узденского заверяю

Директор Академии биологии и биотехнологии ЮФУ


Е.К. Айдаркин

02.12.2014

Анатолий Борисович Узденский,
194/1 пр.Стачки, Ростов-на-Дону, 344090
e-mail: auzd@yandex.ru
Тел/факс: 8-905-428-7254

