

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию А.Ю. Рыбкина «Фотофизические и фотодинамические свойства водорастворимых гибридных структур фуллерен-краситель», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02-биофизика.

Фотодинамическая терапия является широко применяемым методом лечения, в основе которого лежит использование света для генерации в биологическом объекте активных частиц. Фотовозбуждение сенсibilизатора, введенного в опухоль, способно инициировать реакции, разрушающие опухолевые клетки. Для успешного применения в медицинской практике фотодинамические препараты должны удовлетворять следующим требованиям – эффективно поглощать свет в красной области спектра, обладать высоким квантовым выходом в триплетное электронно-возбужденное или радикальной состояние или, селективно накапливаться в опухоли и быстро выводиться из организма.

Настоящая диссертационная работа посвящена развитию научных принципов создания нового класса эффективных фотодинамических препаратов на основе гибридных структур краситель-фуллерен, что может позволить значительно расширить спектр используемых для этих целей красителей и подходов к обеспечению селективного накопления данных соединений в опухоли за счет их самоорганизации. В связи с этим можно с уверенностью сделать вывод, что тема диссертационной работы А.Ю. Рыбкина является актуальной.

Диссертационная работа построена по традиционному плану и содержит в своей структуре литературный обзор, главу «Материалы и методы», три экспериментальные главы, заключение, выводы и список литературы. Диссертация изложена на 167 страницах, содержит 38 рисунков и 10 таблиц. Список литературы включает 270 публикаций.

В главе 1 приведен значительный по объему и подробный по научному содержанию литературный обзор, в котором отражены основные этапы развития фотодинамических методов в медицине, приведены характеристики современных фотосенсibilизаторов и представления о механизмах их действия, в том числе о фотофизических и фотобиологических свойствах традиционных и новых фотосенсibilизаторов, в том числе фуллерена C₆₀ и его производных, а также о фотодинамическом действии различных систем фуллерен-краситель.

Приведенные в литературном обзоре данные свидетельствуют об интенсивном развитии исследований в области создания гибридных структур фуллерен-краситель, в основном с целью применения в фотовольтаике. В зарубежной литературе появились

отдельные публикации, показывающие возможность переноса энергии электронного возбуждения с синглетного электронно-возбужденного состояния красителя на фуллерен. В последние годы опубликованы исследования, посвященные созданию диад фуллерен-краситель, обладающих приемлемой растворимостью в воде. Таким образом, в литературном обзоре подробно обосновывается актуальность водорастворимых структур фуллерен-краситель и исследования фотофизики и фотодинамической активности таких гибридных структур с целью создания нового класса фотосенсибилизаторов.

В главе 2. «Материалы и методы» приведены структурные формулы водорастворимых производных фуллеренов и гибридных структур фуллерен-краситель, а также физические и биохимические методики исследований, используемые в диссертационной работе.

В главе 3 изложено содержание работ по исследованию фотофизических и фотодинамических свойств гибридных структур фуллерен-краситель на основе нековалентных комплексов и ковалентно связанных красителей с водорастворимыми полизамещенными производными фуллерена в водных растворах. В этих экспериментах автором убедительно показано, что фотохимическая активность комплексов фуллерен-краситель обусловлена переносом энергии или электрона с синглетного электронно-возбужденного состояния красителя на фуллерен. На примере ковалентных структур фуллерен-флуоресцеин, имеющих различные заряды на красителе и фуллереновом фрагменте, показано, что электростатический фактор, наряду с гидрофобными, является одним из важнейших, контролирующих эффективность этого процесса. Обнаружен важный эффект - увеличение фотостабильности красителя в комплексе по сравнению с несвязанным красителем, что должно способствовать фотодинамической терапии.

Следует отметить, что модельная фотохимическая реакция, приводящая к образованию супероксида, в которой тестируются исследуемые комплексы и ковалентные структуры, является достаточно сложным процессом, в котором участвуют жертвенный донор NADH, молекулярный кислород и краситель, фиксирующий супероксид. Автором диссертации показано, что в водном растворе данная система может количественно характеризовать фотодинамическую активность исследуемых фотодинамических структур. Однако сразу возникает вопрос, будет ли регистрироваться такая фотодинамическая активность исследуемых гибридных молекул в биологических структурах, например в мембранах, в клетках, в ДНК, и, в конечном счете, в опухолях живого организма.

В главе 4 с целью приближения условий эксперимента к биологическим объектам был исследован процесс протекания фотохимической реакции с участием нековалентных и ковалентных структур фуллерен-краситель в модельной системе на основе лецитиновых липосом. Диссертантом обнаружено, что при введении в липосомы нековалентных комплексов фуллерен-краситель их фотохимическая активность существенно снижается вследствие распада комплексов при их локализации в мембранах. Однако фотохимическая активность ковалентных диад фуллерен-флуоресцеин сохраняется неизменной и значительно

превышает фотохимическую активность исходного красителя и фуллерена. Это дает основание полагать, что при введении в биологические структуры ковалентных диад фуллерен-краситель их фотодинамическая активность будет значительно превышать суммарную фотодинамическую активность исходного красителя и фуллерена.

В главе 5 приведены результаты исследования фотодинамического действия гибридных структур фуллерен-флуоресцеин и фуллерен-рубоксил, содержащих красители, характеризующиеся низким квантовым выходом в триплетное состояние, на реальные биологические системы - на структуру ДНК и на опухолевые клетки. Важно отметить, что исследованные соединения не обладают каким-либо заметным цитотоксическим действием в темновых условиях.

Таким образом, в результате проведенных исследований в биологических системах показано, что присоединение красителей, не обладающих регистрируемым фотодинамическим действием, к водорастворимому производному фуллерена значительно повышает суммарную фотодинамическую активность исходных соединений.

В Заключении автор суммирует полученные им результаты, которые позволили ему сформулировать приведенные в работе Выводы.

Анализируя содержание и стиль изложения материала диссертации, можно сделать вывод, что автор непосредственно участвовал в обосновании и постановке основной части экспериментов, в их проведении и в обобщении результатов исследований.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, полученных в диссертации, убедительно подтверждается подробным изложением экспериментального материала диссертационной работы, корректным обобщением и анализом полученных результатов и сопоставлением их с актуальными данными мировой научной литературы в данной области, а также публикацией материалов исследований в 6 научных публикациях в рецензируемых журналах и в коллективных монографиях, представлением в виде 10 устных и стендовых докладов на конференциях.

Новизна диссертационной работы определяется следующими полученными в ней новыми результатами:

- разработаны и обоснованы оригинальные принципы создания водорастворимых гибридных структур фуллерен-краситель на основе нековалентных комплексов и ковалентных диад фуллерен-краситель для фотодинамической терапии:

- продемонстрировано значительное усиление фотодинамической активности гибридных структур фуллерен-краситель по сравнению с активностью индивидуальных молекул красителя и фуллерена в водных растворах и в модельных биологических системах: в липосомах, в ДНК и в опухолевых клетках;

- методами оптической спектроскопии установлено, что усиление фотодинамического эффекта достигается за счет эффективной дезактивации электронно-возбужденных

синглетных состояний красителя путем переноса электрона или электронного возбуждения с красителя на фуллерен, что значительно расширяет выбор эффективного красителя для создания новых типов фотосенсибилизаторов.

- показано, что фотодинамическая активность гибридных структур может регулироваться путем изменения электростатических зарядов на фуллерене и красителе, при этом изменяется их растворимость и способность образовывать комплексы, что способствует селективному накоплению в опухолях.

Результаты проведенных исследований представляют большой интерес для развития дальнейших научных и прикладных работ с целью создания высокоэффективных фотодинамических препаратов нового поколения для применения в различных областях медицины.

В результате можно констатировать, что диссертационная работа А.Ю. Рыбкина представляет собой законченную научно-исследовательскую работу на актуальную тему.

Оформление диссертации удовлетворяет требованиям ВАК РФ. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

В результате анализа содержания диссертационной работы следует сделать следующие критические замечания.

1) В диссертационной работе экспериментально показано, что при объединении красителя и фуллерена в комплекс или в ковалентную молекулярную структуру и селективном фотовозбуждении красителя осуществляется перенос возбуждения или электрона с красителя на ядро фуллерена и последующая генерация на фуллереновом ядре активных форм кислорода. При этом осуществляется регистрация только супероксида, а генерация синглетного кислорода не контролируется. Весьма желательно осуществить контроль генерации синглетного кислорода, что позволит уточнить механизм процесса.

2) При анализе тушения флуоресценции автор использует формализм Штерна-Фольмера, который в основном справедлив для динамического тушения. Однако в изученных системах образуются сильно связанные комплексы, поэтому было бы полезно применить другие модели процессов тушения.

3) Обнаружено необычное за пределами зависимости действия фотосенсибилизатора на клетки, что требует дополнительного объяснения.

4) В тексте диссертации и автореферата встречаются досадные опечатки (например в диссертации расстояние переноса электрона равно традиционно 0,7 нм, тогда как в автореферате 1,7 нм, что весьма необычно и требует серьезного обсуждения) и не совсем стандартная терминология.

Отмеченные недостатки не снижают общую положительную оценку представленной работы. Диссертация А.Ю. Рыбкина «Фотофизические и фотодинамические свойства водорастворимых гибридных структур фуллерен-краситель» и ее автореферат соответствуют требованиям Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а Александр Юрьевич Рыбкин несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02- биофизика.

Официальный оппонент
доктор химических наук,
ведущий научный сотрудник
руководитель группы Фотоники химических и биологических систем
Лаборатории физико-химических основ регуляции биологических систем
Федерального бюджетного учреждения науки

Институт биохимической физики РАН
Левин Петр Петрович



Подпись доктора химических наук Левина П.П. заверяю:

Ученый секретарь Федерального бюджетного учреждения науки

Институт биохимической физики РАН

к.х.н. Долгая Н.Н.



«24» марта 2016 г.



Сведения об оппоненте

Левин Петр Петрович

Доктор химических наук по специальности 02.00.15 «Химическая кинетика и катализ»

Основное место работы:

лаборатория физико-химических основ регуляции биологических систем Федерального государственного бюджетного учреждения

«Институт биохимической физики РАН», ведущий научный сотрудник

119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

Тел. 495-939-71-05

E-mail: levinp@sky.chph.ras.ru

Основные публикации по теме диссертации:

- 1) P. P. Levin, A. F. Efremkin, N. B. Sultimova, V. V. Kasparov, I. V. Khudyakov "Decay Kinetics of Benzophenone Triplets and Corresponding Free Radicals in Soft and Rigid Polymers Studied by Laser Flash Photolysis" *Photochemistry and Photobiology*, IF 2.287, 2014 pp. 1-5, DOI: 10.1111/php.12170.
- 2) O. V. Demina, P. P. Levin, N. E. Belikov, A. V. Laptev, A. Y. Lukin, V. A. Barachevsky, V. I. Shvets, S. D. Varfolomeev, A. A. Khodonov " Synthesis and photochromic reaction kinetics of unsaturated spiropyran derivatives" *J. Photochem. and Photobiol. A: Chemistry*, IF 2.416, 2013, 270, pp. 60– 66, DOI: 10.1016/j.jphotochem.2013.06.023.
- 3) P.P Levin, A.S.Tatikolov, N.L. Zaichenko, A.I.Shienok, L.S.Koltsova, O.U.Oskina, I.R.Mardaleishvili, L.D.Popov, S.I.Levchenkov, A.A. Berlin "Kinetics of photochemical reactions of multifunctional hybrid compounds based on spironaphthoxazines upon photoexcitation with light of different wavelengths" *J. Photochem. and Photobiol. A: Chemistry*, IF 2.416, 2013, 251, No 1, pp. 141– 147, DOI: 10.1016/j.jphotochem.2012.10.013.
- 4) P. P. Levin, I. V. Khudyakov "Laser flash photolysis of benzophenone in thin silicone films" *Chemical Physics Letters*, IF 2.145, 2013, 570 pp. 61–63, DOI: 10.1016/j.cplett.2013.03.077.
- 5) A. V. Laptev, D. E. Pugachev, A. Y. Lukin, A. V. Nechaev, N. E. Belikov, O. V. Demina, P. P. Levin, A. A. Khodonov, A. F. Mironov, S. D. Varfolomeev, V. I. Shvets " Synthesis of 5,10,15,20-tetra[6'-nitro-1,3,3-trimethylspiro-(indolino-2,2'-2H-chromen-5-yl)]porphyrin and its metal complexes" *Mendeleev Commun.*, IF 1.052, 2013, 23, pp. 199–201, DOI: 10.1016/j.mencom.2013.07.006.
- 6) P.P. Levin, A. S. Tatikolov, A. V. Laptev, A. Y. Lukin, N. E. Belikov, O. V. Demina, A. A. Khodonov, V. I. Shvets, S. D. Varfolomeev. "The investigation of the intermediates of spiropyran retinal analogs by laser flash photolysis techniques with different excitation

wavelengths" J. Photochem. and Photobiol. A: Chemistry, IF 2.416, 2012, 231, No 1, pp. 41–44, DOI: 10.1016/j.jphotochem.2011.12.024.

7) P. P. Levin and I. V. Khudyakov «Laser Flash Photolysis of Benzophenone in Polymer Films» J. Phys. Chem. A, IF 2.771, 2011, 115, No 40, pp. 10996-11000, DOI: 10.1021/jp2072183.

8) N. L. Zaichenko, A. I. Shienok, L. S. Koltsova, I. R. Mardaleishvili, A. S. Tatikolov, P. P. Levin, and A. A. Berlin «Bifunctional photosensitive compound for optical processors» Phys. Status Solidi C 2011, 8, No. 9, pp. 2746–2748, DOI: 10.1002/pssc.201084039.

9) P. P. Levin, A. F. Efremkin, I. V. Khudyakov "Kinetics of benzophenone ketyl free radicals recombination in a polymer: reactivity in the polymer cage vs. reactivity in the polymer bulk" Photochemical & Photobiological Sciences, IF 2.618, 2015, V 14, № 5, pp: 891-896, DOI: 10.1039/c5pp00024f.