

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию
на соискание ученой степени кандидата химических наук
РОМАНЮКА Андрея Владимировича
на тему: «Полимерные нанореакторы на основе полиоксалата: получение,
свойства и биомедицинское применение»
по специальностям 02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические
науки и 03.01.04 – биохимия, химические науки.

Расширяющееся применение высокомолекулярных соединений для нужд медицины позволило ввести в клинический обиход новые препараты и средства. Стало обыденным использование тромболитических ферментов, биокатализаторов для устранения нарушений функционирования желудочно-кишечного тракта, конъюгатов антитело-лекарство. Актуально увеличение количества таких препаратов и средств, поскольку их медицинское использование способствует разработке новых высокоэффективных приемов диагностики и лечения. На расширение потенциального арсенала средств современного врача направлено диссертационное исследование Андрея Владимировича РОМАНЮКА. Важность создания новых подходов к терапии раковых патологий подчеркивается в его работе обращением к высокомолекулярным соединениям для достижения значимого и продолжительного воздействия синглетного кислорода на очаг поражения. Последовательное изучение систем полимерных нанореакторов достоверно приблизило диссертанта к обоснованному планированию медико-биологических этапов дальнейшего исследования, чему определенно способствуют полученные в диссертационной работе данные. Таким образом, работа является актуальной.

Представленная к защите диссертация имеет традиционное построение, изложена на 209 страницах, содержит 73 рисунка, 12 таблиц, список литературы из 363 наименований.

Обзор литературы отличает многоплановость рассмотрения проблемы и четко прослеживаемая взаимосвязь его разделов. Автором описаны виды полимерных нанореакторов. Показана их пригодность для диспергирования веществ малорастворимых в воде, возможность защиты реагирующих соединений от гидролиза, обоснован выбор для достижения упомянутых эффектов нанореакторов вида «ядро-оболочка». Для их получения перспективно использование амфифильных полимеров. Среди них проявляют заметную адсорбцию на поверхности раздела фаз плкюроники (имеющие порой высокую гибкость цепи). Отмеченные свойства обосновывают возможность их использования для получения различных мицеллярных систем и эмульсий. В материалах обзора литературы аргументировано представлена эффективность фотодинамического воздействия на онкологические поражения благодаря токсическому эффекту (в очаге патологии) синглетного кислорода. Его генерация может быть обусловлена функционированием полимерных нанореакторов. Последовательно изложены данные об активных формах кислорода и окислительном стрессе в биологических системах. Завершающее представление хемилюминесцентных реакций способствовало обоснованному выбору соискателем (на основе анализа представленных данных) направления диссертационного изучения – использование пероксиоксалатной реакции в сконструированных полимерных нанореакторах с перспективой фотодинамического воздействия на раковые клетки синглетным кислородом.

Весьма тщательно изложена Экспериментальная часть диссертации. Продемонстрирована высококачественная очистка реактивов во избежание побочных реакций и эффектов. Вдумчиво и грамотно использованы в исследовании синтетические и физико-химические методы. Аккуратно выполнены работы с клетками в культуре. Точность исполнения и постоянный контроль лимитирующих параметров позволила автору получить внятные и надежные исследовательские результаты.

Данные диссертационного изучения показали, что солюбилизация высокоактивного оксалата - бис-(4-нитрофенил) оксалата /БНФО/ - и

активатора – тетраметилового эфира гематопорфирина IX /ТМГП/ - мицеллами плуроников при добавлении пероксида водорода обнаруживает излучение света. Это свидетельствует, что порфирин ТМГП может быть активатором пероксиоксалатной реакции. Сравнительное изучение демонстрирует увеличение интегральной хемилюминесценции с ростом размеров ассоциатов (плуроник L61). Введение оксалата в гидрофобную среду увеличивает эффективность пероксиоксалатной реакции, но только этого фактора недостаточно для повышения стабильности оксалатов.

Защита оксалатов от гидролиза предстает условием эффективного выделения синглетного кислорода. Выход пероксиоксалатной реакции увеличивается в полимерных ассоциатах (плуроник L61) и эмульсионных (ДМФ/плуроник L64/вода) нанореакторах. Важно заметить, что полимерный оксалат оказывается на порядок более устойчивым к гидролизу, чем его низкомолекулярный аналог, обуславливая преимущество полимерной формы в качестве субстратов пероксиоксалатной реакции.

Тестирование эмульсионных нанореакторов на клетках аденокарциномы молочной железы человека показало проникновение частиц эмульсии (по интенсивности красной флуоресценции порфирина /ТМГП/) внутрь клеток. Применение зонда SOSG, чувствительного к синглетному кислороду и способствующему за счет образования SOSG-EP зеленой флуоресценции, продемонстрировало образование синглетного кислорода в клетках при попадании в них частиц эмульсий. Чувствительность последних к уровню пероксида водорода в клетках (по изменению значений IC_{50}) подтверждала селективность используемых эмульсионных нанореакторов к клеткам с повышенной концентрацией пероксида водорода и токсический эффект синглетного кислорода, генерируемого ими.

Ресурсом повышения эффективности полимерных нанореакторов эмульсионного типа оказывается формирование их комплексов с поликатионами (поли (N,N-диметиламиноэтилметакрилат, ПДМАЭМА).

Благодаря этому меняется заряд эмульсионных частиц с отрицательного на положительный, что способствует их увеличенному электростатическому связыванию с отрицательно заряженной поверхностью клеток, увеличивая захват ими частиц эмульсий и снижая примерно в 1,6 раза значение IC_{50} .

Полученные в диссертационном исследовании результаты позволили аргументировано сформулировать приведенные в работе выводы. Они не только закрепляют фундамент из собранных данных, но и обоснованно демонстрируют перспективные пути последующих изучений.

Довольно обширна библиография работы. Автор указывает 363 ссылки литературы. Интересно отметить, что среди них 29,2 % приведенных публикаций выпущены за последние восемь лет (2010-2017 годы). При этом представлено: 4,4 % ссылок за 2016 год, 3,6 % - за 2015, 3,9 % - за 2014, 2,2 % - за 2013 годы. Анализ данных библиографии демонстрирует широту охвата сведений научной литературы соискателем с заметным использованием недавних публикаций, подтверждающих актуальность современного развития рассматриваемой в диссертации проблемы.

В работе имеются дискуссионные аспекты и ремарки. Обосновывая выбор бисфенола А (БФА) как мономера для сополиконденсации (стр. 144 диссертации) для получения полиоксалата, автор упоминает прооксидантную активность бисфенола А благодаря образованию активных феноксильных радикалов, способствующих накоплению пероксида водорода. Однако вне рассмотрения и упоминания в материалах диссертации оказалось взаимодействие бисфенола А с каталазой. Между тем, показано, что бисфенол А ингибирует каталазу (детоксифицирующую пероксид водорода), а на молекулярной поверхности фермента имеются центры связывания бисфенола А, индуцирующие в результате этого окислительный стресс (Jayakanthan M., Jubendradas R., D'Cruz S.C., Mathur P.P. A use of homology modeling and molecular docking methods: to explore binding mechanisms of nonylphenol and bisphenol A with antioxidant enzymes. *Methods Mol. Biol.*, 2015, 1268, 273-289).

Такие данные вполне могли поставить новые задачи тестирования синтезированного полиоксалата в настоящем или последующих изучениях.

Для экспериментов с клетками опухолей были выбраны клетки аденокарциномы молочной железы человека (стр. 124). При этом универсальной особенностью опухолей различного происхождения (стр. 64) предстает (по материалам диссертации) измененный метаболизм кислорода. Таблица 6 (стр. 62-63) показывает, что содержание/скорость образования пероксида водорода различна у разных клеточных линий. Было бы целесообразно выделить группу раковых клеточных линий с повышенным содержанием пероксида водорода (скажем, выше определенного уровня H_2O_2 , как $3 \text{ нмоль}/10^4 \text{ клеток/ч}$ или $0,08 \text{ мкМ}/1 \text{ мг ткани}$) для привлечения внимания исследователей к возможным лечебным целям будущих работ.

Взвешенные рекомендации автора по дальнейшей разработке темы (стр. 185-186) достаточно аккуратны и осторожны. Вместе с тем, без упоминания остался вопрос способа введения нанореакторов в организм, оценка эффективности их доставки к очагам поражения, накопления в клетках опухолей, как и селективности воздействия (особенно в сравнении с сопутствующими центрами воспаления с активированными нейтрофилами). Полное рассмотрение перспектив выполненного исследования способствует гармоничному формированию междисциплинарного коллектива исполнителей работы на последующих этапах изучения.

В тексте настоящей диссертации имеется избыточное количество сокращений (стр. 187-188). Казалось, что это станет понятно диссертанту при приведении в представленной работе такого полного списка сокращений. Однако вышло совсем не так. Список представлен: 26 русских сокращения и 23 английских, в сумме 49 сокращений на двух страницах, но умеренности в использовании сокращений достигнуто не было.

Приведенные замечания не умаляют значимости представленной работы. К достоинствам диссертационного исследования следует отнести внятность его

последовательного представления и обоснованную данными работы обращенность к перспективам её будущих этапов.

Диссертант демонстрирует на начальной стадии изучения пригодность мицелл амфифильных сополимеров в качестве нанореакторов для проведения пероксиоксалатной хемилюминесцентной реакции. Полученные результаты способствовали развитию использованного подхода для перехода к полимерным формам оксалата. Для них в значительной степени пригодны именно нанореакторы вида ядро-оболочка. В работе экспериментально апробировано использование мицеллярных (действенность которых оценивалась по интенсивности хемилюминесценции) и эмульсионных (эффективность которых определялась по интенсивности хемилюминесценции и образованию синглетного кислорода) нанореакторов. Было обнаружено, что полимерные оксалаты проявляют себя как субстраты пероксиоксалатной реакции со значительным преимуществом перед их низкомолекулярными аналогами, а образующийся в результате протекания пероксиоксалатной реакции в эмульсионных нанореакторах синглетный кислород обуславливает их токсический эффект на раковые клетки. Включение поликатиона в состав полимер-коллоидных комплексов полиоксалата увеличивает их токсичность, снижая величину IC_{50} и повышая эффективность подавления раковых клеток в состоянии окислительного стресса в 3-5 раз.

Научные результаты исследования обоснованно способствовали формулированию диссертантом аргументированных и достоверных выводов. По данным диссертационного изучения опубликовано три статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных базах данных и рекомендованных Минобрнауки РФ. Автореферат диссертации достаточно полно отражает представленные в ней результаты. Работа изложена внятно и четко, добросовестно оформлена, имеет междисциплинарный характер. Кандидатская диссертация А.В. Романюка является научно-квалифицированной работой, содержащей решение важной для биохимии задачи – эффективного использования в нанореакторах пероксиоксалатной

реакции с изучением возможности применения биогенного пероксида водорода как метаболического прооксидантного инициатора продуцирования синглетного кислорода.

По актуальности темы выполненного исследования, его богатому экспериментальному материалу, научной новизне (опирающейся на использование полимерных форм оксалатов в нанореакторах) и практической значимости (связанной с перспективой антиракового применения нанореакторов с пероксиоксалатной реакцией), степени обоснованности, достоверности и новизны сделанных в диссертационном исследовании научных положений, выводов и рекомендаций настоящая работа отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова и предъявляемым к кандидатским диссертациям, соответствует критериям, определенным пп. 2.1-2.5 «Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова», а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 «Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова».

Содержание диссертации соответствует паспортам специальностей 02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические науки (п. 9 «Целенаправленная разработка полимерных материалов с новыми функциями и интеллектуальных структур с их применением, обладающих характеристиками, определяющими области их использования в заинтересованных отраслях науки и техники») и 03.01.04 – биохимия, химические науки (п. 5 «Анализ и синтез биологически активных веществ, выяснение их физиологического действия и возможностей применения полученных веществ в медицине и других отраслях народного хозяйства» и п. 14 в части «Изучение роли активных форм кислорода, продуктов перекисного окисления и свободнорадикальных продуктов в нарушениях и регулировании метаболических процессов в биосистемах»).

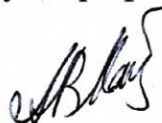
Таким образом, соискатель – Андрей Владимирович РОМАНЮК – заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.06 — высокомолекулярные соединения, химические науки и 03.01.04 — биохимия, химические науки.

Официальный оппонент

Ведущий научный сотрудник отдела биоинженерных технологий и поддержки научных исследований Института экспериментальной кардиологии

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,

доктор биологических наук, профессор



Александр Васильевич Максименко

« 20 » ноября 2017 года

Контактные данные:

тел.: 7 (495) 414 60 25, e-mail: alexmak@cardio.ru

Специальности, по которым официальным оппонентом
защищена диссертация:

14.00.06 – кардиология, 03.00.04 – биохимия, биологические науки

Адрес места работы:

121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт
экспериментальной кардиологии

Тел.: 7 (495) 414 60 25; e-mail: info@cardioweb.ru

Подпись профессора А.В. Максименко заверяю

Ученый секретарь

ИЭК ФГБУ «НМИЦ кардиологии»

Минздрава РФ



С.А. Левашова