

ОТЗЫВ

официального оппонента Крука Николая Николаевича на диссертационную работу Моршнева Филиппа Константиновича “Хлориновые фотосенсибилизаторы для антимикробной и противоопухолевой ФДТ: синтез, физико-химические свойства, биологическая активность”, представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.4.4. Физическая химия и 1.4.3. Органическая химия

Диссертационная работа Моршнева Филиппа Константиновича посвящена молекулярному дизайну и синтезу новых фотосенсибилизаторов на основе макроцикла хлорина и последующему комплексному изучению влияния архитектуры функционального замещения макроцикла на физико-химические характеристики полученных фотосенсибилизаторов в водных и неводных растворах, исследованию их противоопухолевой и антимикробной активности. В качестве магистрального направления исследования выбрана структурная модификация периферического замещения хлоринового макроцикла, который способен обеспечить требуемые спектрально-люминесцентные и фотофизические характеристики для использования в противоопухолевой и антимикробной фотодинамической терапии: интенсивную полосу поглощения в окне прозрачности биологических тканей и высокий квантовый выход фотосенсибилизированного образования синглетного молекулярного кислорода. Вместе с тем, высокая гидрофобность тетрапиррольного макроцикла представляет собой барьер для практического применения соединений на базе хлорина в качестве лекарственных форм из-за низкой растворимости и склонности соединений к агрегации, которая приводит к резкому увеличению вероятности безызлучательной дезактивации энергии электронного возбуждения, снижая тем самым эффективность фотосенсибилизированного образования активных форм кислорода. Преодолеть данный барьер можно путем конъюгирования гидрофобного макроцикла с полярными группами, однако при этом необходимо соблюсти гидрофильно-липофильный баланс, так как недостаточная липофильность снижает скорость трансмембранного транспорта фотосенсибилизатора и уменьшает селективность накопления в целевых органах, что в совокупности негативно сказывается на эффективности фотодинамической терапии. Вариант решения этой комплексной мультидисциплинарной проблемы и предлагает в своей работе диссертант. С учетом вышеизложенных соображений считаю, что актуальность и практическая значимость диссертационной работы Моршнева Филиппа Константиновича не вызывает никаких сомнений.

Общая характеристика диссертации. Диссертация Моршнева Ф.К. состоит из введения, трех глав, содержащих литературный обзор (Глава 1), методы и методики экспериментальных исследований (Глава 2), полученные новые научные результаты, их анализ и обсуждение (Глава 3), а также заключения, списка сокращений, списка цитируемой литературы, 2 приложений.

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, указаны цель и задачи исследования, сформулирована научная новизна и прак-

тическая значимость работы, описана методология диссертационного исследования, приведены положения, выносимые на защиту, указан личный вклад соискателя. Кроме того, во введении представлена информация об апробации работы, связи темы диссертационного исследования с плановыми исследованиями, вклад автора, дана информация об опубликованности результатов диссертационной работы.

Глава 1 содержит актуальный обзор современных представлений об антимикробной и противоопухолевой фотодинамической терапии. Рассмотрены физико-химические и спектрально-люминесцентные свойства используемых в клинической практике фотосенсибилизаторов на основе хлорина e_6 , вопросы межфазного распределения сенсибилизаторов, генерация активных форм кислорода, агрегация и транспорт сенсибилизаторов посредством эндо- и экзогенных носителей. Значительное внимание уделено методам синтеза потенциальных фотосенсибилизаторов.

В Главе 2 приведены структуры объектов исследования и методики синтеза новых фотосенсибилизаторов, описаны физико-химические и спектроскопические методы исследования, а также методы биологического тестирования фотосенсибилизаторов. Описаны использованные в работе оборудование и химические реактивы.

Глава 3 посвящена изложению, анализу и обсуждению полученных новых научных результатов. Глава состоит из шести разделов, в которых рассмотрен синтез новых сенсибилизаторов с полярными группами, их спектрально-люминесцентные характеристики и фотостабильность в растворах, фотосенсибилизированное ими образование синглетного молекулярного кислорода, результаты изучения межфазного распределения в системе октанол/вода и растворимость в водной среде, взаимодействие с возможными эндо- и потенциальными экзогенными носителями, фотоиндуцированная противоопухолевая и антимикробная активность фотосенсибилизаторов *in vitro*, а также результаты моделирования противоопухолевой фотодинамической терапии *in vivo* у лабораторных животных.

В Приложениях А и Б приведены спектры ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР, масс-спектры (MALDI-TOF и ESI) исследованных соединений (всего 31 спектр), а также сводная таблица спектрально-люминесцентных характеристик фотосенсибилизаторов, дополнительные данные по содержанию транспортных белков в смеси фракций сыворотки крови человека.

В Заключении диссертант тезисно резюмировал результаты выполненных исследований. Считаю необходимым поддержать сделанный автором вывод о том, что предложенные монокатионные фотосенсибилизаторы обладают высоким потенциалом как для противоопухолевой, так и для антимикробной фотодинамической терапии и могут быть рекомендованы для проведения доклинических исследований.

Диссертационная работа изложена на 226 страницах, содержит 75 рисунков, 11 схем, 15 таблиц. Список цитируемой литературы состоит из 293 источников.

Содержание автореферата полностью отражает содержание диссертационной работы.

Основные научные результаты, полученные автором диссертации:

1. Разработаны методики, проведен синтез, выполнена идентификация и исследованы физико-химические характеристики двух новых хлориновых сенсibilизаторов для фотодинамической терапии, содержащих фрагменты L-аргинина или N-метилпиперазина. Обнаружена атропизомерия конъюгата хлорина с N-метилпиперазином. Установлены закономерности фотодегградации полученных сенсibilизаторов в различных условиях.

2. Изучены закономерности распределения фотосенсibilизаторов между водной и псевдолипидной фазами в растворах и установлена высокая аффинность ди- и трикатионных соединений к водной фазе, определяемая энтропийным фактором. Показано, что фотосенсibilизаторы связываются с мицеллами ПАВ Твин 80, и установлено, что сайты связывания локализованы во внешнем слое мицелл вблизи полярных оксиэтиленовых групп.

3. Определены основные закономерности влияния функционального замещения на связывание сенсibilизирующих агентов эндогенными носителями – транспортными белками крови. Установлено, что ди- и трианионные хлорины переносятся в основном альбуминовой, монокатионные хлорины – липопротеиновой фракцией плазмы, а поликатионные хлорины не образуют устойчивых комплексов с эндогенными носителями. Показано, что ПАВ Твин 80 и ПВП не влияют на характер связывания с эндогенными носителями.

4. Установлено, что степень накопления фотосенсibilизаторов и их фотоцитотоксичность в отношении опухолевых клеток коррелирует со сродством сенсibilизаторов к липидной фазе, причем показано, что исследованные сенсibilизаторы главным образом локализованы в эндоплазматическом ретикулуме и митохондриях. Новые хлориновые сенсibilизаторы обладают выраженной фотоцитотоксичностью в отношении нозокомиальных антибиотикорезистентных штаммов Грам-отрицательных бактерий, принадлежащих к группе «ESKAPE».

Достоверность результатов диссертации. Основные научные положения и выводы диссертационной работы Моршнева Филиппа Константиновича основаны на значительном по объему экспериментальном исследовании, которое позволяет адекватно охарактеризовать молекулярную структуру новых фотосенсibilизаторов, их физико-химические и спектроскопические характеристики, а также взаимодействие с возможными эндо- и потенциальными экзогенными носителями и фотоцитотоксичность. Экспериментальные результаты получены диссертантом на современных приборах Центра коллективного пользования научным оборудованием “Верхневолжский региональный центр физико-химических исследований”. Считаю, что основные научные положения и выводы диссертационной работы Моршнева Филиппа Константиновича безусловно являются достоверными.

Автором проведен всесторонний анализ полученных экспериментальных результатов. Формулировке выводов и заключений предшествует детальное обсуждение новых результатов с привлечением современных литературных данных. Таким образом, обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, основанных на общепринятых фундаментальных научных представлениях и логично следующих из результатов работы, не вызывает сомнений.

Замечания по диссертационной работе:

с.15 «...Смертность от рака лёгких составляет около 350 человек в день, делая его одним из самых агрессивных видов злокачественных опухолей...». Следовало указать по какой стране или региону бралась статистика, так как доступная статистика по РФ – 135 чел./день, по миру – 4900 чел./день.

с.21 «... ФС, поглощающие фотоны с $\lambda > 850$ нм, в свою очередь, не способны передать необходимую энергию для генерации синглетного кислорода (~ 94 кДж/моль)...». Здесь для ясности следовало сказать, что «...они не обладают необходимо энергией...» и пояснить, что энергия триплетного состояния сенсibilизатора, с которого и происходит перенос энергии на молекулярный кислород, меньше энергии поглощенных квантов на величину энергетического зазора $\Delta E(S_1-T_1)$.

с.42 В выражении «переход ФС из стандартного в одно из возбуждённых состояний (ФС*)» следовало употребить термин «основного». На этой же странице: «После поглощения фотона происходит несколько фотопроцессов, направленных на сбрасывание лишней энергии возбуждённой молекулы фотосенсibilизатора». Фотопроцессами можно назвать только флуоресценцию и фосфоресценцию, а все остальные указанные в тексте внутримолекулярные и межмолекулярные процессы, происходящие после фотовозбуждения, являются безызлучательными, т.е. темновыми процессами.

с.45 На диаграмме Яблонского (рис. 1.6) изображен перенос энергии с триплетного состояния сенсibilизатора на возбужденное состояние молекулы кислорода ($^1\Sigma_g$), что не верно. На самом деле, перенос происходит на молекулярный кислород в основном состоянии ($^3\Sigma_g$), как правильно указывает сам автор на с. 46. Вероятно, эта ошибка в рисунке перекочевала в диссертацию из работы [178], на которую дается ссылка в подписи к данному рисунку.

с. 49 При описании принципа регистрации синглетного молекулярного кислорода с помощью молекул-ловушек, необходимо четко указать, что образование эндопероксида приводит к обесцвечиванию раствора (т.е. исчезновению полосы поглощения в видимой области спектра), так как длинноволновая полоса поглощения эндопероксида находится в ультрафиолетовой области.

с.50 Хорошо известно, что при (суб)микромольных концентрациях в водных растворах основной надмолекулярной формой водорастворимых тетрапиррольных соединений являются сэндвичеобразные димеры, которые характеризуются существенно отличными от мономеров спектрально-люминесцентными и фотофизическими характеристиками, в том числе значительным падением

квантового выхода фотосенсибилизированного образования синглетного молекулярного кислорода (см. напр., *J. Phys. Chem.*, 1996, V.100, 6555-6560; *Химия выс. энерг.*, 2002, Т.37, 219-233). Эти результаты не отражены в обзоре, в то время как уделено внимание формированию J-агрегатов, которые образуются *только при значениях pH значительно ниже физиологических (3.0-3.5 и ниже) и только для протонированных форм только анионных тетрапиррольных соединений.*

с.83 Математическое выражение (2.3) для расчета доли поглощенных фотонов записано некорректно. Двойное интегрирование – по спектру и по времени – требует наличия в формуле двух дифференциалов: от длины волны dl и от времени dt .

с.100 и с.121-122 Автор предполагает, что гипсохромный сдвиг в спектрах поглощения и флуоресценции при переходе от воды к этанолу может быть вызван формированием H-агрегатов. Действительно, при формировании H-агрегатов для полосы Core наблюдается гипсохромный сдвиг, но он, как правило, более выражен и сопровождается также существенным гипохромизмом полосы, что в данном случае не наблюдается. Автору следовало рассмотреть и альтернативную возможность, обусловленную галохромией – специфической сольватацией ионизирующихся периферических заместителей (см. [205] в диссертации), при которой наблюдается гипсохромный сдвиг полосы Core и Q_x -полос, но батохромный сдвиг Q_y -полос, как раз и наблюдающиеся в представленных спектрах. Изломы кривых титрования раствора вода-этанол (рис. 3.11 б,г) отражают как последовательное изменение структуры водородных связей в растворе при изменении соотношения вода-этанол, так и переход от диссоциированной (ионизированной) формы периферических заместителей в воде к недиссоциированной (неионизированной) форме в растворах с большой долей (45-50 об.% и более) этанола.

с.107 В нескольких местах по тексту йодид-ионы называются атомами йода, что некорректно и противоречит приведенным на с. 108 схемам фотопревращений с их участием. К обсуждению роли йодид-ионов следовало добавить их роль как внешних тяжелых атомов в недиссоциированной форме в липидном окружении, которые усиливают спин-орбитальное взаимодействие (пропорциональное квадрату константы спин орбитальной связи, которая для йода очень велика – 5069 см^{-1}) и, как следствие, приводят к росту квантового выхода фотосенсибилизированного образования синглетного молекулярного кислорода.

с.116 Предположение автора, что «... эффект вызван H-связями и ион-молекулярными взаимодействиями между заряженными функциональными группами растворённых веществ и молекулами воды. В 1-октаноле, имеющем низкую величину диэлектрической проницаемости, эти взаимодействия намного слабее...» является спорным. Эффекты экранирования кулоновских взаимодействий возрастают, напротив, в окружении с высокой диэлектрической проницаемостью, так как сила Кулона в среде с диэлектрической проницаемостью ϵ , обратно пропорциональна ее величине.

с.121 «Сокращение (правильно – уменьшение) интенсивности флуоресценции» не очень удачная характеристика поведения флуоресценции, так как она

может быть использована только для сопоставления характеристик растворов с одинаковой оптической плотностью на длине волны возбуждения, причем обязательно должна рассматриваться интегральная, а не пиковая интенсивность. Корректным было бы измерение квантового выхода флуоресценции, однако в диссертационной работе такие результаты не приводятся.

В тексте встречаются неудачные стилистические обороты и термины, например: с.10 «... Для эффективного проведения сеанса ФДТ необходимы три нетоксичных компонента: светоактивное вещество, известное как фотосенсибилизатор (ФС), молекулярный кислород и источник излучения определённой длины волны...». Полагаю, что понятие токсичности к источнику излучения неприменимо; с.42 «...*Человеческое тело можно упрощённо представить в виде набора липидоподобных мембранных барьеров, разделённых водоподобной средой.*»; с.57 На данной странице и далее в тексте диссертант использует словосочетание «*константа Штерна-Вольмера*» в авторском переводе на русский. Однако, в русскоязычной литературе общепринятым является перевод *константа Штерна-Фольмера*; с.58 Вместо «Альбумин ... обладает ... *низкой вязкостью* в водных растворах» следовало написать «Водные *растворы альбумина характеризуются низкой вязкостью*» и указать значения вязкости; с.86 Вместо «...пока значение растворимости *не переставало меняться менее чем на 10%....*» следовало написать «...пока значение растворимости *менялось не менее чем на 10%*»; с.111 Вместо «...взаимодействуют с O₂ с образованием *синглетных форм* кислорода ...» необходимо было написать «синглетного ¹Δ_g», так как для фотосенсибилизированного образования синглетного ¹Σ_g кислорода у сенсibilизатора недостаточно запасенной при фотовозбуждении энергии; с.116 Автор пишет «... свободные энергии переноса ФС из водной в псевдолипидную среду прямо пропорциональны логарифму коэффициента межфазного распределения...». Взаимосвязь между величинами, безусловно, верна, но с точки зрения причинно-следственных связей корректно говорить, что «...логарифм коэффициента межфазного распределения прямо пропорционален свободной энергии переноса ФС из водной в псевдолипидную среду...»; с.111

Указанные замечания не затрагивают основные научные положения и выводы и не снижают общей положительной оценки диссертационной работы Моршнева Филиппа Константиновича.

Апробация работы и публикации Основные научные результаты диссертации прошли необходимую апробацию на международных и всероссийских научных конференциях, где Моршневым Ф.К. представлены 17 докладов. Основные научные результаты диссертации изложены в 7 научных статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных базах данных, определяемых ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук по соответствующим отраслям и специальностям, в том числе, статьях с квартилем/категорией: Q1/K1 – 4,

Q3/K1 – 2, Q4/K2 – 1. Кроме этого результаты диссертации излагаются в тезисах 17 докладов, опубликованных в сборниках тезисов докладов научных конференций.

Анализ диссертационной работы позволяет заключить, что диссертация содержит большой объем экспериментальных результатов, в ней изложено решение научных задач по направленному синтезу новых фотосенсибилизаторов на основе макроцикла хлорина и исследованию их физико-химических характеристик, межмолекулярных взаимодействий и фотодинамической активности в растворах, *in vitro* и *in vivo*, а диссертант – Моршнев Филипп Константинович – в совершенстве владеет современными методами исследований в области синтеза и физической химии макрогетероциклических соединений, межмолекулярных взаимодействий в растворах и гетерогенных системах и физико-химических основ фотодинамической терапии. Анализ полученных экспериментальных результатов ведется доказательно, с привлечением литературных данных, сопоставлением результатов, полученных различными авторами, либо в рамках различных экспериментальных подходов.

Диссертационная работа Моршнева Филиппа Константиновича “Хлоринные фотосенсибилизаторы для антимицробной и противоопухолевой ФДТ: синтез, физико-химические свойства, биологическая активность” представляет собой законченное квалификационное научное исследование, удовлетворяющее всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук в соответствии с пп. 9-11,13,14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в действующей редакции, а ее автор Моршнев Филипп Константинович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.4.4. Физическая химия и 1.4.3. Органическая химия.

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОППОНЕНТ


Заведующий кафедрой физики
УО “Белорусский государственный
технологический университет”,
доктор физико-математических наук,
профессор

220006, г. Минск, ул. Свердлова 13а
Республика Беларусь
e-mail: m.kruk@belstu.by
тел.: +375 17 399 49 60

28 октября 2025 г.



Крук Н.Н.

Подпись <u>Крук Н.Н.</u>
Свидетельствую: 
Специалист по кадрам БГТУ
« 28 » 10 2025 г.