

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Закоян Анны Артуровны на тему: «Получение комплексов катионных порфиринов с церулоплазмином и трансферрином для фотодинамической терапии» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03. 00. 04 - Биохимия

Фотодинамическая терапия (ФДТ) опухолей является одной из эффективных современных методов лечения онкологических заболеваний. Суть метода заключается в обогащении больной ткани фотосенсибилизатором, способным активироваться при облучении светом определенной длины волны, безвредным для окружающих тканей и пациента. Активация фотосенсибилизатора приводит к образованию активных форм кислорода направленно разрушающих патологическое образование. Преимущества ФДТ по сравнению с другими видами лечения патологии: малая токсичность, высокая скорость выведения из организма действующего соединения, незначительные побочные эффекты, возможность применения в случаях, исключающих хирургическое вмешательство.

В качестве фотосенсибилизаторов часто применяются порфирины и их металлсодержащие производные. Одной из центральных задач ФДТ является эффективная доставка порфиринов к опухолевой ткани. Сывороточный альбумин, гемоглобин и липопротеины являются основными переносчиками порфиринов кровеносной системы. Эффективность процесса ФДТ определяется свойствами производных порфиринов, белков-переносчиков и механизмов их взаимодействия.

В данной работе была исследована возможная пригодность в качестве белков-переносчиков порфириновых фотосенсибилизаторов белков крови, участвующих в ангиогенезе, трансферрина (гликозилированный белок плазмы крови, осуществляющий транспорт ионов железа) и церулоплазмينا (белок плазмы крови, содержащий около 95% всего количества меди сыворотки крови человека).

Перед Закоян Анной Артуровной была поставлена задача выделить и очистить из плазмы крови человека церулоплазмин и трансферрин, исследовать их *in vitro* взаимодействие с катионными порфиринами, перспективными для ФДТ в качестве фотосенсибилизаторов и оценить возможность использования этих белков в качестве переносчиков порфиринов.

Диссертационная работа оформлена на русском языке, изложена на 126 страницах, иллюстрирована 42 рисунками и 8 таблицами. Она состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 192 источника.

Представленная в Литературном обзоре информация обосновывает актуальность для современной медицины выполнения проведенных исследований, в частности, для развития метода фотодинамической терапии в лечении онкологических заболеваний. Описание литературных данных делает очевидным, что диссертант представляет себе метод ФДТ, преимущества производных порфирина, избранных в качестве сенсибилизаторов, в механизме реализации процесса, путей образования активных форм кислорода, их воздействия на клеточную мембрану с иницированием гибели патологической клетки/ткани.

В Литературном обзоре Закоян А.А. проследила историю развития фотодинамической терапии после того, как в начале 20-го века наблюдали опосредованную красителем поглощающим световое излучение, гибель биологических систем. Одним из первых таких красителей были производные гематопорфирина и это положило начало

исследований порфиринов для ФДТ: порфирины были подвергнуты модификациям, снижающим их токсичность в темновых условиях, повышающим растворимость и эффективность для ФДТ. Перечислены клинически одобренные для применения в онкологии фотосенсибилизаторы порфириновой природы первого и второго поколений, и проходящие клинические испытания. Указаны направления исследований для создания фотосенсибилизаторов третьего и четвертого поколений.

В Литературном обзоре приведена информация о развитии технических возможностей реализации ФДТ в онкологии. В частности, эффективность ФДТ зависит от источника света и способа его доставки к целевой опухолевой ткани. Свет может быть доставлен к цели напрямую, эндоскопически или интерстициально с помощью специального зонда. Подчеркнуто значение развития волоконно-оптических систем, как ключевых элементов гибких устройств доставки света, которое расширило как возможности доставки излучения, так и измерения концентрации накопившегося фотосенсибилизатора, прицельного воздействия на пораженные органы и ткани, содержащие фотосенсибилизатор.

Для успешной процедуры ФДТ важны также системы доставки фотосенсибилизаторов: использование активных антител и пептидов, обладающих сродством к рецепторам, специфически экспрессирующимися в опухолевых клетках и/или их сосудистой сети, но не на нормальных клетках.

Например, известно, что церулоплазмин обладает рядом свойств способствующих патогенезу опухолевого процесса. Это – взаимодействие с иммунокомпетентными клетками, способность окислять биогенные амины, регулировать перекисное окисление липидов. Подчеркнута двойственная роль церулоплазмينا в онкологии. С одной стороны, он участвует в метастазировании и способствует ангиогенезу, а с другой - участвует в противоопухолевой защите, так как при определенных условиях усиливает реакции свободнорадикального окисления и подавляет рост опухолевых клеток. Ферроксидазная активность церулоплазмينا способствует встраиванию железа в апо-трансферрин. Медь из церулоплазмينا и железо из трансферрина востребованы в ангиогенезе, способствующем росту опухоли.

В норме, роль трансферрина заключается в транспортировке и доставке железа в клетки. На опухолевых клетках рецепторы трансферрина сверхэкспрессируются, делая трансферрин перспективным носителем противоопухолевых препаратов к онкологическим клеткам. Это было подтверждено опытом, в котором загрузка в наночастицы золота фталоцианина, связанного с трансферрином, привело к увеличению поглощения наночастиц опухолевыми клетками. В другом опыте, конъюгаты анионного порфирина Хлорин e_6 с трансферрином, при активации светом в условиях *in vitro*, проявили антиканцерные свойства относительно клеток аденокарциномы молочной железы человека и крыс.

Приведенные автором диссертации факты обосновывают проведение исследования церулоплазмينا и трансферрина как возможных переносчиков фотосенсибилизаторов в кровеносной системе для повышения их специфического накопления в онкологических клетках.

Одним из преимуществ катионных порфиринов является высокий уровень генерации ими синглетного кислорода. Известно, что активные формы кислорода и, в частности, синглетный кислород, цитотоксичны и способны запускать механизмы гибели опухолевых клеток через апоптоз, некроз или аутофагию. В исследованиях Закоян А. были использованы синтезированные в Армении (Arm) и Великобритании (UK) водорастворимые мезо-замещенные катионные 3- и 4- пиридилпорфирины и Zn-порфирины с различными периферическими функциональными группами, квантовые

выходы синглетного кислорода которых достигают 0,77-0,79 и 0,85-0,97, соответственно.

Автором диссертационной работы были очищены церулоплазмин и трансферрин плазмы крови человека. В исследованиях использованы также лиофилизированный трансферрин корпорации "Sigma" и полученный из него апо-трансферрин. Были приготовлены комплексы выбранных белков с катионными (цинк)порфиринами, а также для сравнения, с используемыми в ФДТ хлорином еб и Al-фталоцианином. Процессы образования и свойства комплексов были исследованы методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии.

Проведено исследование влияния pH и различных концентраций NaCl на процессы образования и оптические свойства белок-порфириновых комплексов; влияния света на фотосенсибилирующие свойства катионных порфиринов в растворе и в комплексах с белками; сравнена оксидазная активность церулоплазмينا свободного и в комплексе с порфиринами.

В рамках диссертационной работы Закоян А. исследовала цито- и фототоксичность порфирина TOEt4PyP относительно клеток HeLa карциномы шейки матки и HepG2 гепатоцеллюлярной карциномы *in vitro*, а также *in vivo* токсичность этого же порфирина и его Zn производного на модели солидной опухоли саркомы S-180 (Croker sarcoma) мышей. Исследованы *in vitro* цито- и фототоксичность комплексов ЦП с Zn-порфиринами в отношении клеток HeLa. Исследованы *in vitro* цито- и фототоксичность катионных порфиринов в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus* 209 P) и грамотрицательных (*E. coli* K-12) микроорганизмов.

Результаты исследований А.Закоян показали, что образование комплексов церулоплазмينا с Zn-порфиринами не влияет на оксидазную активность белка, а освещение комплексов в течение 30 мин не разрушает целостность молекулы белка. Показано, что в исследованных комплексах катионных порфиринов и их Zn-производных с церулоплазмином при физиологических условиях среды (pH 7,4 и 0,9 % NaCl) и в условиях, близких к внеклеточным условиям тканей опухоли ($6,9 \leq \text{pH} \leq 6,2$) значительная часть фотосенсибилизаторов остается в связанном состоянии. Первое из этих наблюдений указывает на устойчивость комплекса в процессе доставки, а второе – на перспективность его антиканцерного эффекта.

В результате проведенных исследований, А. Закоян показала, что в условиях *in vitro* и *in vivo* катионный порфирин TOEt4PyP проявляет значительную фототоксичность при слабой темновой цитотоксичности. На *in vivo* модели саркомы S-180 на мышах минимальная эффективная фототоксичная доза TOEt4PyP была оценена в 45 мг/кг. Ценным результатом является обнаружение автором диссертационной работы достаточно высокой *in vitro* фототоксичности некоторых комплексов церулоплазмينا с Zn-порфиринами при их слабой цитотоксичности. Наиболее эффективный комплекс церулоплазмينا с Zn-TBut4PyP снижал выживаемость клеток HeLa относительно контроля на 86,16 %.

А.Закоян показала также *in vitro* антибактериальную фото-активность порфирина TOEt4PyP и Zn-порфиринов Zn-TOEt4PyP, Zn-TBut4PyP и Zn-TBut3PyP, которые снижали на 99% колониобразующую способность как грамположительных так и грамотрицательных микроорганизмов.

При наличии перечисленного ряда положительных достижений, рецензируемая работа, естественно, не лишена некоторых огрехов, таких, как наличие опечаток и не всегда четких формулировок, например, таких как: «Исследована противоопухолевая активность комплексов [ЦП+Zn-порфирины] в режимах цитотоксического и фототоксического действия *in vitro*».

Далее:

1. В подписи к Рис. 24 ничего не сказано о концентрации комплекса. Это относится также к подписи к Рис. 28 и почти ко всем спектрам, поэтому наблюдаемые гипохромные эффекты (уменьшение поглощения) не всегда убедительны.
2. Пункт 3.5.1, при представлении спектра комплекса необходимо было бы показать не только спектр поглощения порфирина, но и трансферрина.
3. Наблюдаемые изменения в спектрах поглощения автор приводит как косвенное свидетельство конформационных изменений белка в микроокружении фотосенсибилизатора. Жаль, что не сняты дифференциальные спектры исследуемых комплексов относительно спектров компонентов, что позволило бы также оценить константы диссоциации комплексов.
4. В флуоресцентных исследования приводятся только спектры эмиссии, и не показаны спектры возбуждения. Мне лично кажется странным очень большая разница между длинами волн максимумов $\lambda_{\text{возб}}$ и $\lambda_{\text{эмис}}$.
5. На Рис. 37 интенсивности поглощения на пределе чувствительности оптических приборов.
6. Жаль, что не проведены более детальные исследования комплексов порфиринов с трансферрином. Представленные автором в литературном обзоре свойства этого белка кажутся очень перспективными для его использования в ФДТ.

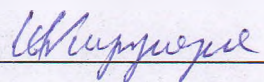
Заключение

Диссертационная работа Закоян Анны Артуровны на тему: «Получение комплексов катионных порфиринов с церулоплазмином и трансферрином для фотодинамической терапии» выполнена на достаточно высоком научно-методическом уровне. Диссертантом успешно решены поставленные перед ней актуальные задачи исследования механизмов взаимодействия церулоплазмينا и трансферрина с порфиринами, используемыми в фотодинамической терапии опухолей. Получены положительные результаты при их *in vitro* и *in vivo* использовании. Полученные данные указывают на перспективность дальнейших исследований противоопухолевого потенциала комплексов катионных порфиринов с церулоплазмином и трансферрином.

В целом диссертационная работа Закоян Анны Артуровны на тему: «Получение комплексов катионных порфиринов с церулоплазмином и трансферрином для фотодинамической терапии» соответствует требованиям предъявляемым ВАК Республики Армения к кандидатским диссертациям по специальности 03. 00. 04 – Биохимия, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук.

Ведущий научный сотрудник Института биохимии НАН РА им. Г.Х.Бунятына,

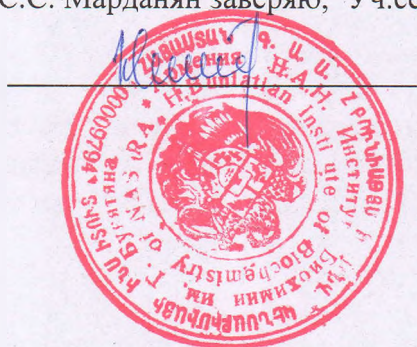
доктор биологических наук,



С.С.Марданян

Подпись доктора биологических наук С.С. Марданян заверяю, Уч.сек. Института биохимии,

кандидат биологических наук,



Р.Л.Айрапетян

01 июля 2022 г.