

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Круппа Инны Сергеевны «Полисахаридные полимеры-носители для физиологически активных нафтальдегидов», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 05.17.06 – Технология и переработка полимеров и композитов.

Многие физиологически активные вещества обладают токсическим действием на организм вследствие трудности обеспечения их медленного контролируемого выделения и целевой доставки в орган-мишень, малой растворимости в водных средах и других причин. В связи с этим, разработка способов получения безопасных медицинских препаратов за счет химического или физического связывания с биосовместимыми полимерами-носителями и тщательного контроля их структуры является актуальной задачей. Одним из наиболее перспективных и активно развивающихся подходов в этой области является присоединение лекарственных веществ к природным или полусинтетическим полимерам, например, полисахаридам, за счет лабильных ковалентных связей, способных к гидролизу в организме без участия ферментов. Автор использовал диальдегидполисахариды, производные карбоксиметилцеллюлозы (ДАКМЦ) и декстрана (ДАД), в качестве полимерных носителей для получения физиологически активных полимеров, содержащих ковалентно связанный природный нафтальдегид госсипол с широким спектром физиологической активности. При гидролизе таких полимерных производных госсипола в физиологических условиях возможно снижение его токсичности для организма при условии оптимизации молекулярной массы полимер-носителя, сохранения физиологической активности действующего вещества или его новых производных, образующихся в результате гидролиза, и обеспечения его контролируемого выделения. Решению этих задач, помимо выбора параметров синтеза производных и установления их химического строения, и посвящена диссертационная работа. Необходимо отметить, что описанные в литературе полимерные производные госсипола недостаточно охарактеризованы, чтобы рассматривать их как потенциально пригодные для создания на их основе безопасных медицинских препаратов. Кроме того, объекты исследования в данной работе принципиально отличаются по химическому строению от других физиологически активных полимеров, предлагаемых для доставки токсического вещества в организм. Синтетический подход, предложенный автором, отличается простотой исполнения и позволяет получать новые полимерные производные госсипола в водных и неводных средах, перспективные для использования в качестве противовирусных лекарственных препаратов.

Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 137 страницах, включает 52 рисунка, 13 таблиц, список литературы из 119 наименований.

Во введении обоснована актуальность исследования, сформулированы его цели и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В литературном обзоре рассмотрены основные направления исследований в области создания полимерных носителей лекарственных средств, химическая структура и биологическая активность госсипола и его производных, способы его гликозилирования, а также способы получения, свойства и химическое строение диальдегидполисахаридов. Обзор достаточно содержателен и интересен для прочтения широкой аудитории.

В третьей главе приведены характеристики исходных веществ, методики проведения экспериментов, а также описаны методы анализа полученных полимеров, продуктов их гидролиза и низкомолекулярных модельных соединений; методы определения цитотоксических свойств госсипола, ковалентно связанного с полимерами-носителями и противовирусного действия полимерных производных госсипола на разных штаммах вируса гриппа А. Необходимо отметить, что использованный перечень современных стандартизованных физико-химических методов анализа, позволил соискателю получить достоверные результаты при исследовании полученных систем как в твердой фазе, так и в растворах.

Вторая глава посвящена обсуждению результатов исследования новых физиологически активных полимеров прививочного типа, полученных при взаимодействии нафталъдегида госсипола с диальдегидполисахаридами: диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой и диальдегиддекстраном, а также обсуждению механизмов реакций и фармакологической активности лекарственного вещества при присоединении нафталъдегида к полимеру-носителю.

В разделе 2.1 описаны способы определения основных физико-химических характеристик полимеров-носителей – карбоксиметилцеллюлозы, декстрана, а также их альдегидсодержащих производных, полученных периодатным окислением в гомогенных или гетерогенных условиях. Методами ЯМР спектроскопии и ГПХ с последовательным двойным детектированием рефрактометрическим и мультиволновым ультрафиолетовым детекторами, выявлены побочные продукты реакции окисления карбоксиметилцеллюлозы, проводимой в гетерогенных условиях. Установлено, что промышленная фармакологически чистая ДАКМЦ содержит трудноотделяемые примеси кислотного характера, основной из которых является гликолевая кислота. Степень окисления полисахаридов определяли с помощью обратного йодометрического

титрования и оксимным методом. Молекулярно-массовые характеристики ДАКМЦ и ДАД в зависимости от степени окисления изучали с помощью методов вискозиметрии и ГПХ. Исследования показали, что при периодатном окислении сильно понижается молекулярная масса полимеров, причем ее снижение пропорционально как времени реакции, так и концентрации периодата. Результаты измерения молекулярно-массового распределения методом ГПХ указывают на отсутствие примеси высокомолекулярной фракции и межмолекулярных сшивок, образованных за счет реакции между альдегидными и гидроксильными группами двух соседних макромолекул. Независимо от степени окисления образующиеся полимеры фракционно однородны и удельное содержание окисленных звеньев не зависит от молекулярной массы фракции. Эти факторы имеют существенное значение для практического применения полимеров-носителей.

В разделе 2.2 приведены основные физико-химические характеристики нафталальдегида госсипола, полученные с помощью методов ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C , ИК Фурье и УФ спектроскопии, MASS MALDI спектрометрии. Показано, что, в зависимости от растворителя, госсипол существует в трех различных формах: альдегидной, лактольной, и кетольной, что согласуется с литературными данными.

Раздел 2.3 посвящен синтезу полимерных производных госсипола в гомогенных условиях и изучению их химического строения. Приведены условия проведения синтеза и данные исследования продуктов с помощью методов ЯМР ^{13}C и ^1H , УФ и ИК спектроскопии с Фурье преобразованием. Показано, что, несмотря на наличие двух альдегидных групп в окисленных звеньях полисахаридов, во взаимодействие с госсиполом вступает только одна из них. По данным спектрального анализа нафталальдегид участвует в реакции в кетольной форме с образованием устойчивой к гидролизу ацетальной связи. При этом продукты реакции содержат как моно-, так и дизамещенные производные госсипола. Для оценки их относительного содержания в работе использован метод ЯМР ^{13}C . По соотношению интегральной интенсивности сигналов атомов углерода альдегидных групп нафталальдегида в замещенной и незамещенной формах можно предположить, что продукты представляют собой эквимольную смесь моно- и дизамещенных производных госсипола. Варьированием условий получения полимерных производных можно менять состав продуктов. Так, в условиях избытка полисахарида связанный госсипол не содержит свободных кетольных групп, что обуславливает отсутствие токсичности соединения. В конце раздела обсуждается возможность присоединения госсипола к неокисленным звеньям полисахаридов и гликозидным звеньям восстанавливающих концов макромолекул на примере полученных автором модельных

соединений – продуктов гликозилирования госсипола в водной и спиртовой средах. В результате анализа полученных спектральных данных (ЯМР ^{13}C , масс-спектры) обнаружено, что в боратном буфере конденсация нафталальдегида с глюкозой протекает с вовлечением ОН группы при С1 аномерном атоме углерода. Вторичные спиртовые группы глюкозы при С2, С3, С4 в реакцию не вступают. Для подтверждения стерических затруднений образования дизамещенного нафталальдегида автором изучена реакция взаимодействия госсипола с глюкозой в спиртовых условиях. С помощью квантово-механических расчетов и анализа ^{13}C ЯМР спектров установлено, что присоединение двух молекул α -глюкозы, имеющей ОН группу при аномерном углеродном атоме в аксиальном положении не вызывает сильных стерических затруднений, тогда как замещение госсиполом экваториальной ОН-группы β -глюкозы стерически невозможно. В результате, в условиях избытка глюкозы в реакции образуется смесь моно- и дизамещенного продуктов в мольном соотношении 1:3, при эквимольном соотношении и в условиях избытка госсипола образуется продукт моногликозилирования.

Проведенные исследования позволили автору определить химическое строение продуктов, образующихся при кислотном гидролизе госсипол-содержащих физиологически активных полимеров в условиях, моделирующих физиологические. Анализ этих данных приведен в разделе 2.4 диссертации. По данным ГПХ, гидролиз полимеров с молекулярной массой порядка 60 кДа приводит к полному исчезновению высокомолекулярного пика и появлению на хроматограммах интенсивных пиков низкомолекулярных веществ с массой менее 1 кДа. В ^{13}C ЯМР спектрах низкомолекулярных продуктов гидролиза отсутствуют сигналы гликозидных фрагментов в области 50 - 90 м.д., а также сигналы углеродных атомов альдегидной группы госсипола в форме полуацетали. Полученные данные согласуются с анализом масс-спектров продуктов. Таким образом, автором установлено, что при кислотном гидролизе полученных полимерных производных не наблюдается выделения свободного госсипола, а только продуктов его декарбонилирования – апогоссипола и окисленных нафтохинонов. Гидролиз модельных низкомолекулярных гликозидов приводит к образованию сходной смеси продуктов.

В разделе 2.5 оценена биологическая активность полученных полимерных производных госсипола, которая зависит от химического строения выделившегося в ходе кислотного гидролиза низкомолекулярного физиологически активного вещества. Цитотоксические свойства оценивали по определению максимальной концентрации препарата, при которой выживает 50% клеток в эксперименте *in vitro*. Оказалось, что они сильно зависят от содержания в полимере монозамещенного нафталальдегида, имеющего в

своей структуре незамещенную альдегидную группу. При их отсутствии концентрация препарата может достигать 50 мг/мл, что свидетельствует об отсутствии токсичности таких полимерных производных. В результате *in vitro* исследования противовирусного действия полимерных производных госсипола на разных штаммах вируса гриппа была установлена специфическая противовирусная активность исследуемых полимерных производных в зависимости от содержания связанного нафталальдегида в полученных полимерных производных.

Таким образом, в результате проведенных исследований автором синтезированы и охарактеризованы две группы неизвестных ранее госсиполсодержащих физиологически активных полимеров на основе ДАД и ДАКМЦ, отличающихся различной молекулярной массой, количеством окисленных звеньев и удельным содержанием госсипола. Установлена химическая структура полученных полимерных производных госсипола и показано, что реакция протекает с участием альдегидных групп окисленных звеньев полисахаридов и гидроксильной группы при аномерном атоме углерода восстанавливающих концов макромолекул с образованием относительно стабильной ацетальной связи. При этом окисленные диальдегидные звенья ДАКМЦ и ДАД реагируют как монофункциональные, а альдегидная группа госсипола вступает в реакцию в кетольной форме в выбранных условиях проведения синтеза. Гликозилированием госсипола в спиртовой и водной щелочной средах получены модельные соединения, позволившие выявить механизм взаимодействия ароматических альдегидов с макромолекулами диальдегидполисахаридов, а также строение продуктов гидролиза полимерных производных. Обнаружено, что при гидролизе полимерных производных в условиях, моделирующих физиологические, образуются нафтохиноны с элиминированными альдегидной и изопропильной группами, а также продукты их дальнейшего окисления, при этом свободный госсипол не выделяется. Идентифицирован ряд не описанных ранее гликозидов нафтохинонов и продуктов их вторичных превращений. В этом состоит научная новизна работы. Необходимо отметить, что диссертантом выполнено комплексное исследование, получены оригинальные результаты по синтезу и физико-химическому исследованию полимерных производных госсипола при взаимодействии с диальдегидсодержащими производными карбоксиметилцеллюлозы и декстрана.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в том, что на примере полученных полимерных производных госсипола показано, что модель Х. Рингсдорфа для физиологически активных полимеров прививочного типа не применима при использовании диальдегидполисахаридов в качестве носителей ароматических

альдегидов. Обнаружен эффект существенного снижения токсичности *in vitro* при ковалентном связывании госсипола с полимерами-носителями. Синтезированные полимеры могут быть рекомендованы для дальнейших исследований в качестве перспективных противовирусных лекарственных препаратов.

Материал диссертации изложен логично, выводы убедительны, соответствуют полученным экспериментальным данным и подкреплены анализом литературного материала. Однако существует ряд замечаний и пожеланий:

1. Работа содержит умеренное количество опечаток. Однако они существенно затрудняют прочтение работы, как и отсутствие необходимых запятых во многих предложениях по тексту автореферата и диссертации. Например, заголовок таблицы 7 (74-я стр. диссертации) не позволяет понять, о чем идет речь: «Полимеры ДАКМЦ с ковалентно связанная с нафтальдегидом госсиполом».
2. Литературный обзор недостаточно критичен. В заключительной части литературного обзора следовало обосновать выбор объектов исследования, сформулировать цель и задачи исследования.
3. Список литературы оформлен не по ГОСТу и содержит, на мой взгляд, излишнее количество справочной литературы. Например, ссылка на использование сшитых полисахаридов, не являющихся предметом исследований, содержит 8 литературных источников, большинство из которых – справочники и учебники. В 20-ой ссылке (и не только) отсутствуют авторы публикации и год издания, в 22-ой (и не только) нет названия публикации. Ссылки на публикации за последние 5 лет составляют менее 10%, за последние 10 лет – 22%.
4. На стр. 46 диссертации автор именует КМЦ как «1,4- α -6-карбоксиметилглюкозу». Поскольку это производное целлюлозы, звенья которой соединены β -гликозидной связью, то непонятно, почему здесь указана α -связь? И на основании каких данных выявлено замещение только по 6-му углеродному атому? В методической части указана лишь степень замещения – 65%.
5. Глава «Обсуждение результатов» начинается с анализа низкомолекулярных примесей продукта гетерогенного окисления КМЦ. Однако методическая часть не содержит сведений об этом продукте. Коммерческие образцы окисленной КМЦ присутствуют, например, в таблице 2 (стр. 58) под кодовым названием «УПП 1,01», откуда невозможно понять, каково содержание окисленных звеньев в структуре полимера.
6. В табл. 7 диссертации приведены данные о содержании связанного с полимером госсипола в ч./млн. В других разделах диссертации эти данные представлены как «содержание связанного госсипола» в мг/мл, «концентрация связанного госсипола» в %.

Более понятно для интерпретации полученных результатов с точки зрения химического строения полученных полимерных производных было бы привести одно из стандартных в химии полимеров понятие – степень замещения, содержание замещенных звеньев и т.п. К сожалению, выводы автора из представленных в таблице данных отсутствуют, как и указание на то, по результатам какого метода были проведены расчеты. Далее автор отмечает, что «При равномольном соотношении полисахарида и госсипола образуется полимер, содержащий смесь моно- и дизамещенных молекул госсипола в соотношении 1:1». Однако данные об общем содержании связанного полимером госсипола в табл. 7 отсутствуют. Эта же таблица в автореферате (№ 1) вместо раздела «Синтез в условиях избытка ДАКМЦ» содержит ряд опечаток.

7. На стр. 81-82 автор отмечает «два основных пика поглощения: $\lambda_1 = 217$ нм и $\lambda_2 = 312-324$ нм» в спектрах поглощения «продуктов присоединения госсипола к ДАКМЦ, полученных в гетерогенных условиях с использованием ацетона в качестве осадителя». Однако наблюдаемый частокл пиков в области 200-280 нм можно, скорее, отнести к остаткам ацетона в образцах и к продуктам, его загрязняющим.
8. В таблице 8 (номер 7, ошибочно указанный автором, стр. 84 диссертации) непонятны обозначения образцов 1К5-8. Ранее этот код в тексте не упоминается.

Сделанные замечания не затрагивают основных выводов и защищаемых положений диссертационной работы Инны Сергеевны Круппа. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации. Материал диссертации изложен в виде 4-х статей в журналах, рекомендованных ВАК, тезисов к 7 докладам на научных конференциях и полностью отражен в опубликованных работах. В статьях показана перспективность использования полученных физиологически активных полимеров для эффективной доставки лекарственных средств в организм. На примере полимерных производных госсипола показано, что классическая модель, предложенная Х. Рингсдорфом в середине 1980-х годов и предполагающая выделение активного вещества в организме в неизменном виде за счет гидролиза лабильной химической связи с полимером-носителем, не является универсальной и не применима в случае использования диальдегидполисахаридов в качестве носителей ароматических альдегидов. Автором обнаружен эффект существенного понижения токсичности *in vitro* при ковалентном связывании госсипола с полимерами-носителями. Синтезированные полимеры могут быть рекомендованы для дальнейших исследований в качестве перспективных противовирусных лекарственных препаратов. По результатам работы получено положительное решение на выдачу патента РФ и подана заявка патента РСТ. Таким образом, работа является существенным вкладом

в создание новых прогрессивных методов создания материалов биомедицинского назначения и модифицирования их свойств.

Диссертационная работа Круппа Инны Сергеевны «Полисахаридные полимеры-носители для физиологически активных нафтальдегидов» является завершенной научно-квалификационной работой и по актуальности, научной новизне, достоверности и практической значимости полученных результатов отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор, Круппа Инна Сергеевна, заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата химических наук по специальности 05.17.06 – Технология и переработка полимеров и композитов.

Ведущий научный сотрудник

лаборатории твердофазных химических реакций

ИСПМ РАН,

доктор химических наук

Акопова Татьяна Анатольевна

Полное наименование организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН

Адрес: 117393, г. Москва, ул. Профсоюзная, д.70

E-mail: akopova@ispm.ru; dir@ispm.ru

Тел.: +7 (495) 335-91-00; +7 (495) 332-58-73

15 августа 2017 г.

Подпись Акоповой Татьяны Анатольевны

Заверяю

Ученый секретарь ИСПМ РАН,



Т.В. Попова