

На правах рукописи

Курьянова Анастасия Сергеевна

**АКТИВНОСТЬ БЕНГАЛЬСКОГО РОЗОВОГО И МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В
ПРИСУТСТВИИ АМФИФИЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ И ПОЛИСАХАРИДОВ В
ФОТОГЕНЕРАЦИИ СИНГЛЕТНОГО $^1\text{O}_2$ КИСЛОРОДА**

Специальность 1.4.7 – Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральном исследовательском центре химической физики им. Н. Н. Семенова Российской академии наук, г. Москва.

- Научный руководитель:** **Соловьева Анна Борисовна,**
доктор химических наук, профессор
- Официальные оппоненты:** **Мелик-Нубаров Николай Сергеевич,**
доктор химических наук, ведущий научный сотрудник Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова
- Шухто Ольга Владимировна,**
кандидат химических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Ивановский государственный химико-технологический университет
- Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет»

Защита диссертации состоится «__» _____ 2024 года в __ ч. ____ мин. на заседании диссертационного совета 24.1.243.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук (ФИЦ ХФ РАН) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФИЦ ХФ РАН: <http://www.chph.ras.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
24.1.243.01
кандидат химических наук

Татьяна Александровна Ладыгина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Растущая антибиотикорезистентность патогенных микроорганизмов, положившая конец «эре антибиотиков», длившейся последние 50 лет, привела исследователей к поиску альтернативных антибактериальных терапевтических средств, к которым бактерии не смогут легко выработать устойчивость [1].

Эффективным методом лечения локальных инфекционных воспалительных процессов, активно развивающимся в последние годы, является антибактериальная фотодинамическая терапия (АФДТ) или фотосенсибилизированная инактивация патогенных клеток, опосредованная активными формами кислорода (АФК) [2]. Метод АФДТ основан на способности возбужденных молекул фотосенсибилизатора, (ФС), (предварительно введенного в пораженную область ткани) передавать энергию возбуждения молекулярному кислороду с образованием активных форм кислорода (прежде всего синглетного кислорода 1O_2). Молекулы ФС, перешедшие при поглощении видимого света определенной длины волны в возбужденное синглетное состояние (нестабильное, с периодом полураспада от 10^{-6} до 10^{-9} с), в свою очередь могут вернуться в основное состояние, излучая свет (флуоресценция) или тепло. Но вероятен также переход в возбужденное триплетное состояние ($^1\text{ФС} \rightarrow ^1\text{ФС}^* \rightarrow ^3\text{ФС}^*$), после чего становится возможным процесс переноса энергии возбуждения на молекулы кислорода в триплетном состоянии с образованием синглетного кислорода. Кроме того, в возбужденном триплетном состоянии ФС может передавать электрон субстрату клетки, что приводит к образованию свободных радикалов, взаимодействующих с кислородом. При этом также образуются АФК – супероксид, гидроксильные радикалы и перекись водорода. Здесь особенно важно отметить, что в отличие от антибиотиков, которые специфически воздействуют на определенные мишени в микробной клетке (клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, репликацию ДНК, транскрипцию или трансляцию белков), генерируемые ФС АФК вызывают окислительное повреждение компонентов как липидной, так и белковой природы, а также нуклеиновых кислот. Считается, что такой множественный окислительный характер повреждений клеточных компонентов препятствует развитию микробной резистентности, делая тем самым АФДТ перспективным способом борьбы с возбудителями заболеваний, устойчивыми к действию традиционных препаратов [3].

Поскольку необходимый для возбуждения молекул ФС процесс освещения ограничен патологической зоной, АФДТ применяется исключительно при терапии локализованных воспалительных процессов в отличие от системных инфекций, таких как бактериемия. В отличие от ФДТ рака, где ФС обычно вводится в кровоток и накапливается в опухоли, АФДТ осуществляется путем локальной доставки ФС в пораженную зону в виде инъекций, нанесения геля или аэрозоля, смачивания.

В клинической практике при лечении методом АФДТ гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей в настоящее время преимущественно применяют ФС порфириновой природы – фотосенс, фотодитазин, радахлорин, аласенс [4]. В последние годы в качестве ФС при АФДТ исследуются также антраценовые красители (АК) – эозин, рибофлавин, толуидиновый синий, бенгальский розовый (БР) и метиленовый синий (МС), более фотостабильные и доступные по сравнению с порфиринами и обладающие, как фотосенсибилизирующими, так и собственными антибактериальными свойствами [5-7]. В частности, для БР и МС характерен высокий квантовый выход Φ_{Δ} генерации синглетного 1O_2 кислорода ($\Phi_{\Delta \text{БР}} \sim 0,8$ и $\Phi_{\Delta \text{МС}} \sim 0,5$ соответственно) [6, 7]. Однако следует указать, что БР и МС, как практически и все порфириновые ФС, склонны к агрегации в водных растворах уже при низких концентрациях, что понижает их активность в процессах фотогенерации 1O_2 . Ранее сотрудниками лаборатории модифицированных полимерных систем ФИЦ ХФ им. Н. Н.

Семенова РАН было показано, что в присутствии некоторых амфифильных полимеров (АП) агрегированность молекул порфириновых ФС уменьшается. Это приводило к повышению фотосенсибилизирующей активности ФС в генерации синглетного 1O_2 кислорода в модельной реакции фотоокисления триптофана в воде, а также к ускорению процесса заживления инфицированных ран у лабораторных животных при их лечении методом АФДТ с использованием порфириновых ФС [8, 9]. Активность ФС в фотогенерации 1O_2 определяли по скорости фотоокисления триптофана, тестовой реакции для установления активности фотосенсибилизаторов разных классов [8].

Следует указать также, что для повышения эффективности лечения длительно незаживающих гнойных ран в медицинской практике совместно с АФДТ часто используют биологически активные соединения, обладающие ранозаживляющим и противовоспалительным действием – ферменты, антиоксиданты, полисахариды (ПС) (прежде всего хитозан и альгинат натрия – ХТЗ, АН соответственно) [10, 11].

Целью настоящей работы является создание эффективных фотосенсибилизирующих систем для АФДТ на основе антраценовых красителей, амфифильных полимеров и полисахаридов, а также исследование механизма влияния полимеров на активность красителей в модельной реакции фотоокисления органического субстрата (триптофан) и в условиях *in vivo* при лечении полнослойной плоскостной раны у лабораторных животных.

В качестве ФС были использованы АК: анионный краситель флуороновой природы – бенгальский розовый, а также катионный краситель фенотиразиновой природы – метиленовый синий, которые проходят доклинические и клинические исследования в качестве фотосенсибилизирующих препаратов для ФДТ.

В качестве АП были выбраны подробно изученные и используемые в медицине и фармакологии полимеры – поли-N-винилпирролидон (ПВП), полиэтиленгликоль (ПЭГ) и плуроники F108 и F127. Наличие в разрабатываемых АК-АП системах полисахаридов – поликатионного ХТЗ и полианионного АН, обладающих противомикробными и ранозаживляющими свойствами, позволит повысить эффективность АФДТ при лечении инфицированных ран.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие **основные задачи**:

- определить фотосенсибилизирующую активность красителей БР и МС в реакции фотоокисления триптофана в зависимости от их концентрации в водном и буферном (PBS) растворах;
- определить активность двухкомпонентных систем на основе красителей с амфифильными полимерами и полисахаридами АК-АП и АК-ПС в реакции фотоокисления триптофана в воде и PBS в зависимости от природы красителя и полимеров, а также от соотношения выбранных компонентов в системах;
- определить влияние амфифильных полимеров на спектральные свойства и фотосенсибилизирующую активность систем АК-ПС;
- установить природу межмолекулярных взаимодействий в двух- (АК-АП и АК-ПС) и трех- (АК-АП-ПС) компонентных системах, влияющих на фотосенсибилизирующую активность АК в фотоокислении триптофана;
- провести предварительные исследования эффективности разрабатываемых систем при лечении модельных ран у лабораторных животных методом АФДТ.

Научная новизна работы

Впервые разработаны фотосенсибилизирующие системы на основе антраценовых красителей и амфифильных полимеров – АК (БР, МС)-АП (ПВП, плуроник F108), обладающие высокой фотосенсибилизирующей активностью в генерации синглетного 1O_2 кислорода. Данные системы оказались также более эффективными по сравнению с соответствующими исходными красителями при лечении методом АФДТ полнослойной

плоскостной раны у лабораторных животных.

С использованием метода ^1H -ЯМР спектроскопии впервые показано наличие межмолекулярных взаимодействий в системе краситель–поливинилпирролидон, приводящих к разагрегированию ассоциатов АК, что определяет рост удельной фотосенсибилизирующей активности ФС.

Показано, что электростатические взаимодействия в системе АК-ПС уменьшают фотосенсибилизирующую активность красителей в генерации $^1\text{O}_2$. Так, активность анионного БР падает в присутствии хитозана в 2 раза, а активность катионного МС – в 1,5-3,5 раза в присутствии альгината натрия.

Показано, что введение АП в системы, содержащие краситель и полисахарид, приводит практически к полному восстановлению исходной активности красителей, что связано с блокировкой амфифильными полимерами взаимодействия БР-ХТЗ и МС-АН.

Взаимодействие молекул АК (БР, МС) с макромолекулами плуроника F108 в водном растворе приводит к изменению надмолекулярной структуры полимера, что, в частности, следует из данных АСМ по структуре поверхности пленок, формирующихся на слюдяной подложке при концентрировании и испарении водных растворов, содержащих указанные компоненты.

Практическая значимость

Полученные данные могут быть использованы при разработке препаратов на основе композиции «антраценовый краситель-полимер» для лечения локализованных инфекционных процессов (труднозаживающие хронические раны, трофические язвы, осложненные ожоги) методом антибактериальной фотодинамической терапии. Ввиду присутствия в композиции полисахаридных соединений – альгината натрия и хитозана, проявляющих собственные бактерицидные и ранозаживляющие свойства, такие системы могут быть более эффективны в отношении микроорганизмов, чем обычно используемые фотосенсибилизирующие препараты.

Положения, выносимые на защиту

1. Установленные зависимости эффективной константы $k_{эфф}$ скорости реакции фотоокисления триптофана от концентрации красителей в водном и буферном (PBS) растворе, а также зависимости $k_{эфф}$ в присутствии двух- (АК-АП и АК-ПС) и трех- (АК-АП-ПС) компонентных систем от концентрации АП и ПС, соотношения полимерных компонентов в системе и природы АК.
2. Данные ^1H -ЯМР спектроскопии об изменении химических сдвигов сигналов протонов молекул АК и ПВП в системах БР-ПВП и МС-ПВП в дейтерированной воде (D_2O) по сравнению со ^1H -ЯМР спектрами индивидуальных компонентов.
3. Данные по степени анизотропии флуоресценции исходных антраценовых красителей (БР, МС), двойных (АК-АП и АК-ПС) и тройных (АК-АП-ПС) систем в водных и фосфатно-буферных растворах.
4. Данные АСМ по структуре поверхности исходных красителей (БР, МС), полимеров (F108, ХТЗ) и их смесей (БР-F108, МС-АН, БР-F108-ХТЗ и МС-F108-АН), полученных путем испарения на слюдяной подложке соответствующих водных растворов, содержащих указанные компоненты.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК, и 11 тезисов докладов в материалах международных и российских конференций. В совместных работах автор принимал участие в подготовке и проведении экспериментальных исследований, в обсуждении и обработке полученных результатов, написании и подготовке работ к печати.

Диссертационная работа является частью плановых исследований, проводимых в ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семенова РАН в лаборатории модифицированных полимерных систем, которые выполняются при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований

(проект 20-32-90097), Российского научного фонда (проект 23-23-00409) и в рамках госзадания ФИЦ ХФ РАН № 122040400099-5.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на 60-ой Всероссийской научной конференции МФТИ (Москва, 2017), XIX, XXII, XXIII, XXIV ежегодных научных конференциях отдела полимеров и композиционных материалов ФИЦ ХФ РАН (Москва, 2018, 2021, 2022, 2023), на 26-th, 27-th International Laser Physics Workshop (LPHYS'17 Казань, LPHYS'18 Ноттингем), на 4-ой российской конференции по медицинской химии с международным участием «Медхим-Россия» (Екатеринбург, 2019), XI International Conference on Chemistry for Young Scientists “Mendeleev 2019” (Санкт-Петербург, 2019), XXXI Международной конференции «Лазеры в науке, технике, медицине» (Москва, 2020) и XIII школе молодых ученых стран СНГ по химии порфиринов и родственных соединений (Иванова, 2022).

Структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, выводов, приложения, списка основных сокращений и списка цитируемой литературы (213 наименований). Работа изложена на 133 страницах печатного текста, включая 43 рисунка и 11 таблиц.

Основное содержание работы

Во введении обосновывается актуальность темы диссертационной работы и дается ее краткая характеристика. Формируются цели работы и задачи исследования, а также основные положения, выносимые на защиту.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Первая глава посвящена литературному обзору теоретических и экспериментальных данных, относящихся к тематике диссертационной работы. Обсуждены современные представления о химической структуре, фотосенсибилизирующих и спектральных характеристиках антраценовых красителей – метиленового синего и бенгальского розового. Рассмотрен механизм действия АФДТ и ее преимущества перед другими методами лечения локальных хронических инфекций (труднозаживающие раны, ожоги, трофические язвы, диабетические стопы, псориаз). Рассмотрены современные представления об основных характеристиках амфифильных полимеров – плуроников, поливинилпироллидона и полиэтиленгликоля. Обсуждены физико-химические и биологические свойства природных полисахаридов – альгината натрия и хитозана.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В качестве фотосенсибилизаторов были использованы антраценовые красители: бенгальский розовый (БР) (натриевая соль 4,5,6,7-тетрахлор-2',4',5',7'-тетрайодфлуоресцеина, 95 %, Sigma-Aldrich, США) и метиленовый синий (3,7-бисдиметиламинофенотиазин хлорид, ЧДА, Химмед, Россия). Химические структуры красителей, обладающих фотосенсибилизирующими свойствами, представлены на рисунке 1.

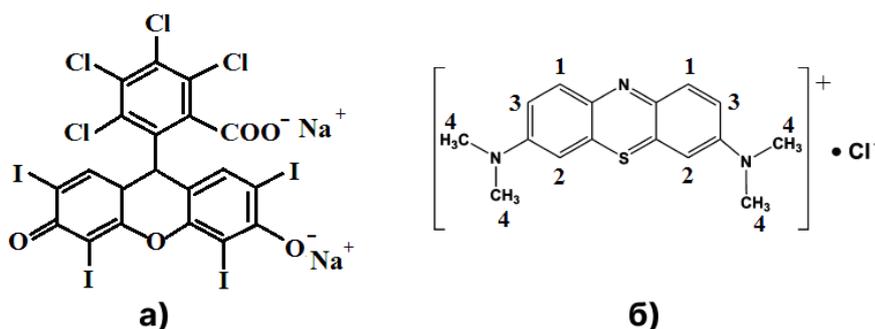


Рисунок 1. Химические структуры красителей – бенгальского розового (а) и метиленового синего (б)

В качестве АП были взяты тройные (А-В-А типа) блок-сополимеры этилен- и пропиленоксидов плюроники F108 (ММ 14,6 кДа, Fluka, США) и F127 (ММ 12,6 кДа, Sigma-Aldrich, США), поли-N-винилпирролидон (ПВП) (ММ 40 кДа, Sigma-Aldrich, США) и полиэтиленгликоль (ПЭГ) (40 кДа, Serva, Германия). В качестве полисахаридов, которые обладают ранозаживляющим эффектом, были использованы хитозан со средней молекулярной массой (ХТЗ) (ММ 50 – 190 кДа, степень деацетилирования 75 – 85 %, Sigma-Aldrich, США) и альгинат натрия (АН) ($10 - 600 \times 10^3$ г/моль, Neofroxx, Германия). В качестве субстрата использовали D, L – триптофан (ТРП) (Acros Organics, Бельгия). Химические структуры полимеров и триптофана приведены в диссертации.

2.2. Получение фотосенсибилизирующих систем на основе антраценовых красителей и полимеров (АК-АП, АК-ПС и АК-АП-ПС)

Для приготовления реакционной системы антраценовые красители, АП и альгинат натрия растворяли в воде, хитозан был растворен в 2 %-ной уксусной кислоте. При изучении фотосенсибилизирующих свойств БР и систем БР-ХТЗ, БР-АП-ХТЗ бенгальский розовый и амфифильные полимеры растворяли в фосфатно-буферном растворе (PBS) (рН 7,2 – 7,6, Sigma-Aldrich, США). Ионная сила (I) PBS растворов составляла $I = 0,14$ моль/л. Затем растворы представленных компонентов смешивали в определенных соотношениях, причем порядок смешения не влиял на активность системы. Концентрация БР варьировалась от 2×10^{-6} М до 1×10^{-5} М, концентрация МС – от $2,5 \times 10^{-6}$ М до 1×10^{-5} М. Концентрацию АП меняли в диапазоне 0 – 0,8 % масс. Концентрация ХТЗ в реакционном растворе составляла 0,005 – 0,015 % масс., концентрацию АН меняли от 0,000625 до 0,010 % масс. рН для систем БР-ХТЗ и БР-АП-ХТЗ составлял 4,5, для систем БР-АП, МС-АП, МС-АН и МС-АП-АН рН = 7 – 7,2.

2.2.1. Исследование фотосенсибилизирующих свойств полученных систем в генерации 1O_2 в водных и PBS растворах

Фотосенсибилизирующую активность антраценовых красителей в присутствии амфифильных полимеров и полисахаридов в процессе генерации синглетного 1O_2 кислорода определяли в модельной реакции фотоокисления триптофана в водном и PBS растворе по изменению оптической плотности полосы поглощения (бенгальский розовый) или по изменению интенсивности флуоресценции (метиленовый синий) триптофана. В полученные реакционные системы, описанные в п. 2.2., добавляли ТРП. Концентрация субстрата в системах БР и БР-полимер составляла 1×10^{-4} М. В системах на основе МС, в связи с высокой интенсивностью флуоресценции красителя, концентрация ТРП составляла $1,5 \times 10^{-5}$ М, так, чтобы $I_{\max} \leq 1000$ отн. ед. Реакционную смесь предварительно перемешивали на магнитной мешалке (“Heidolph”, скорость перемешивания 250 об/мин, Германия) в течение 15 мин при комнатной температуре в отсутствие освещения. Затем реакционную смесь помещали в кварцевую кювету ($V = 3$ мл, толщина $l = 10$ мм), включали освещение и начинали отсчет времени реакции. Реакцию фотоокисления ТРП проводили кислородом воздуха при постоянном перемешивании. Освещение осуществляли с помощью светодиодного фототерапевтического аппарата «АФС» (ООО «Полироник», Россия) с длиной волны $\lambda = 530$ нм (для систем, где АК – бенгальский розовый) и $\lambda = 660$ нм (для систем, где АК – метиленовый синий), мощностью 220 и 1100 мВт, соответственно. Кинетику процесса фотоокисления субстрата фиксировали по уменьшению оптической плотности полосы поглощения триптофана (ТРП $\lambda_{\max} = 280$ нм) в случае БР или по уменьшению интенсивности полосы при $\lambda_{\text{испус.}} = 356$ нм в спектре флуоресценции ТРП (длина волны возбуждения $\lambda_{\text{возб.}} = 280$ нм) для систем, где АК–МС.

Для сопоставительной оценки фотосенсибилизирующей активности красителей и их комплексов с АП и полисахаридами использовали эффективную константу $k_{\text{эфф}}$ скорости

фотоокисления триптофана, которую рассчитывали по формуле:

$$k_{\text{эфф}} = \frac{C_0 - C_t}{C_0 \times \Delta t \times C_{\text{фс}}}$$

где C_0 и C_t – исходная концентрация субстрата и концентрация ТРП в момент времени t , $C_{\text{фс}}$ – концентрация фотосенсибилизатора (метиленовый синий и бенгальский розовый). Число измерений – не менее 10 раз, ошибка измерений составляла не более 10 %.

2.3. Методы исследования природы взаимодействий в системах АК-полимер

2.3.1 Спектральные методы исследования

• *Электронные спектры поглощения и спектры флуоресценции*

Возможные взаимодействия между антраценовым красителем и амфифильными полимерами или полисахаридами фиксировали по изменению положения и интенсивности полос в электронном спектре поглощения (ЭСП) и спектре флуоресценции БР и МС. ЭСП бенгальского розового и метиленового синего в исследуемых растворах снимали на спектрофотометре *Cary 50* (Varian, Австралия), спектры флуоресценции БР и МС исследовали с помощью спектрофлуориметра *Cary Eclipse* (Varian, Австралия) (длина волны возбуждения $\lambda_{\text{возб.БР}} = 550$ нм и $\lambda_{\text{возб.МС}} = 665$ нм). Метод получения систем АК-АП, АК-ПС и АК-АП-ПС описан в п. 2.2.

• *¹H-ЯМР спектроскопия*

Спектры ¹H-ЯМР регистрировали на спектрометре высокого разрешения Bruker AVANCE III 500 MHz (Германия) при комнатной температуре (22,4 °C) с рабочей частотой 500 МГц. Краситель (БР, МС), ПВП и их смесь (массовое соотношение 1:1) растворяли в D₂O (Sigma-Aldrich, 99 ат. % D) и помещали в стандартные стеклянные ампулы (внешний диаметр 5 мм). Спектры ¹H записывали с использованием стандартной импульсной программы, включающей последовательность 90° импульсов длительностью 15 мкс с задержкой между ними 10 с и числом накоплений 128. Калибровку шкалы химических сдвигов осуществляли по остаточным протонам сигнала растворителя (H₂O, $\delta_{\text{H}} = 4,80$ м. д.). Измерения ¹H-ЯМР спектроскопии выше описанных образцов проводили на оборудовании аналитического центра коллективного пользования на базе ФИЦ ПХФ и МХ РАН в г. Черноголовке под руководством к.х.н. Черняка А. В.

• *Степень анизотропии флуоресценции*

Степень анизотропии (поляризации) флуоресценции (r) исходного АК, а также двух- (АК-ПС, АК-АП) и трех- (АК-АП-ПС) компонентных систем на его основе автоматически рассчитывалась спектрофлуориметром *Cary Eclipse* (Varian, Австралия) по значениям G , I_{VV} и I_{VH} в спектрах испускания флуоресценции исследуемых растворов по формуле:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}}$$

где G — фактор коррекции монохроматора для вертикально и горизонтально поляризованного излучения, I_{VV} — интенсивность флуоресценции при вертикальной поляризации возбуждения и регистрируемого сигнала, I_{VH} — интенсивность флуоресценции при вертикальной поляризации возбуждения и горизонтальной поляризации регистрируемого сигнала. Для определения r исследуемые растворы возбуждались светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб.БР}} = 555$ нм и $\lambda_{\text{возб.МС}} = 665$ нм. Анизотропию реакционных смесей регистрировали при длине волны $\lambda_{\text{БР}} = 585$ нм и $\lambda_{\text{МС}} = 685$ нм. Ошибка измерений составляла не более 3%, число измерений одного образца – 8 – 10 раз.

2.3.2. Динамическое рассеяние света

Методом динамического рассеяния света (ДРС) были определены величины гидродинамических диаметров частиц АК и АП в водном растворе, а также частиц АК и АП в двухкомпонентных системах АК-АП при эквимольном соотношении компонентов. Исследования проводили на анализаторе Photocor Complex (ООО «Фотокор» Россия и Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Оказалось, что в интервале использованных концентраций АК размер частиц полимеров не менялся в присутствии красителей. Соответствующие данные приведены в главах 3 и 4 диссертации.

2.3.3. Атомно-силовая микроскопия

Методом атомно-силовой микроскопии исследована структура поверхности тонких пленок ($S \leq 10$ нм), полученных путем испарения водных растворов исходных полимеров (F108, АН, ХТЗ), а также двух- и трехкомпонентных систем БР-F108, БР-F108-ХТЗ, МС-АН и МС-АН-F108, на слюдяной подложке при комнатной температуре в беспылевом шкафу в течение недели. Были выявлены структурные особенности надмолекулярной организации амфифильных полимеров и полисахаридов в присутствии красителей.

Концентрация АК в однокомпонентном растворе составляла 1×10^{-3} М и 5×10^{-5} М (БР и МС соответственно). В растворе, содержащем АК и полимеры, концентрация АК составляла 5×10^{-6} М и $2,5 \times 10^{-6}$ М (для БР и МС соответственно). Концентрация полимеров: [F108] = 0,073 % масс., [ХТЗ и АН] = 0,005 % масс. Для каждой системы было получено 5 образцов и для каждого образца проводили не менее 10 измерений на разных участках поверхности. АСМ – изображения получали, проводя измерения в полуконтактном режиме (Solver P47, “NT-MDT”, Россия) с использованием кантилеверов серии “etalon НА-NC” с жесткостью 3,5 – 12,0 Н/м и резонансной частотой 140 – 235 кГц (радиус закругления 10 нм). Размеры изображения – 10×10 мкм и 3×3 мкм при частоте сканирования 1 Гц с разрешением 512×512 пикселей.

ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ АМФИФИЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ НА ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ БЕНГАЛЬСКОГО РОЗОВОГО В РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ТРИПТОФАНА

Как уже было отмечено, бенгальский розовый в водном растворе даже при низких концентрациях ($C \leq 2 \times 10^{-6}$ М) склонен к агрегации, что приводит к понижению активности АК в фотогенерации 1O_2 , а, следовательно, и к снижению эффективности метода АФДТ.

Для получения эффективных фотосенсибилизирующих систем в качестве разагрегирующих агентов для АК были использованы амфифильные полимеры. С этой целью необходимо было установить влияние концентрации АП на фотосенсибилизирующую активность БР в генерации синглетного 1O_2 кислорода в водном растворе.

Исследования проводились с использованием в качестве АП плуроников (F108, F127), ПВП и ПЭГ, которые, как было показано ранее, способны образовывать слабосвязанные нестехиометрические комплексы с молекулами порфириновых ФС, что приводит к разагрегации и повышению фотодинамической активности порфириновых фотосенсибилизаторов в модельных процессах фотоокисления. Это также было показано в *in vitro* и *in vivo* экспериментах [8, 9, 12, 13].

3.1. Фотосенсибилизирующая активность БР в воде и PBS

На рисунке 2 представлена зависимость эффективной константы скорости ($k_{эфф}$) реакции фотоокисления триптофана от концентрации БР. Видно, что с увеличением концентрации бенгальского розового величина $k_{эфф}$ падает. Возможно, это связано с ростом

содержания агрегированных форм антраценового красителя при увеличении его концентрации в водном и PBS растворе. При этом кривые 1 и 2 на рисунке 2 практически совпадают, что свидетельствует о независимости характера агрегации БР от присутствия солей (входящих в состав буферного раствора).

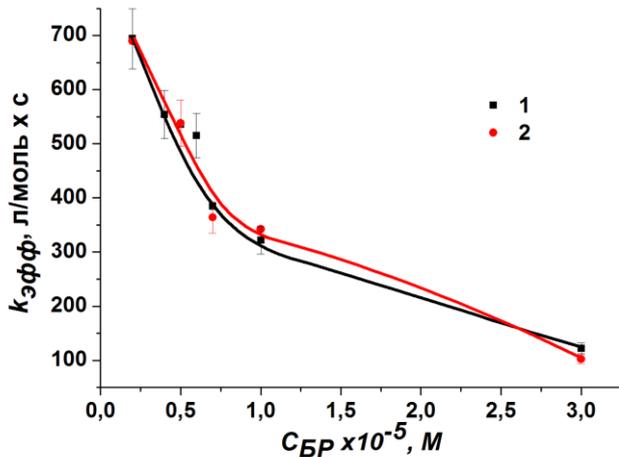


Рисунок 2. Зависимость эффективной константы скорости ($k_{эфф}$) реакции фотоокисления триптофана (1×10^{-4} М) от концентрации бенгальского розового в воде (1) и PBS (2)

3.1.1. Электронные спектры поглощения и спектры флуоресценции БР в воде и PBS

Процесс агрегации бенгальского розового отражается в его ЭСП и спектрах флуоресценции (рис. 3 а и б).

В спектре поглощения БР присутствуют основная полоса с максимумом при $\lambda = 550$ нм, ассиметричная интенсивная ($\epsilon = 1 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), которая относится к мономерной форме АК, и небольшое «плечо» в области $\lambda = 515 - 520$ нм, относящееся к димерной форме БР (рис. 3 а). Как видно из рисунка 3 а, с увеличением концентрации бенгальского розового в воде и PBS растут значения оптической плотности при $\lambda = 515$ нм и 550 нм в его ЭСП, что свидетельствует о росте содержания как димерных, так и мономерных форм молекул БР. Следует отметить, что с увеличением концентрации БР с 2×10^{-6} М до 5×10^{-6} М в воде наблюдается экстремальный рост интенсивности (I) флуоресценции и небольшой батохромный сдвиг полосы флуоресценции красителя. При увеличении концентрации БР больше чем 5×10^{-6} М наблюдается тушение флуоресценции, снижающее величину I , (рис. 3 б), что подтверждает образование димеров и более крупных ассоциатов молекул флуорофора. Аналогичный, но немного менее выраженный эффект наблюдается и в спектре флуоресценции БР в PBS (рис. 3 б, врезка).

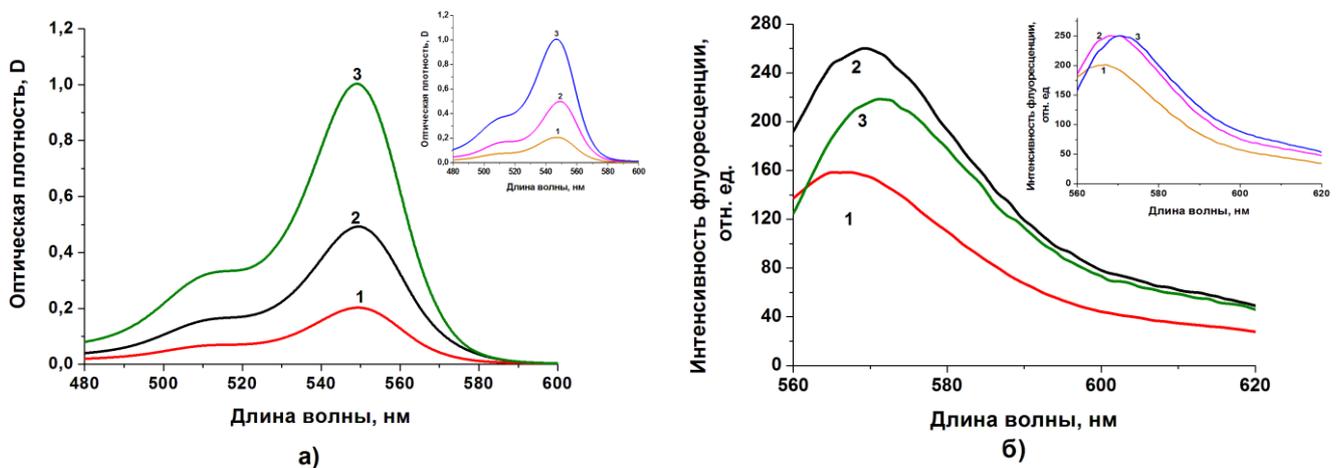


Рисунок 3. Электронные спектры поглощения (а) и спектры флуоресценции (б) БР в воде при концентрациях 2×10^{-6} М (1), 5×10^{-6} М (2) и 1×10^{-5} М (3). Врезки: а) ЭСП и б) спектры флуоресценции (б) БР в PBS при тех же концентрациях красителя.

3.2. Особенности фотокаталитической активности систем БР-АП

Как уже упоминалось выше, ранее было показано, что в присутствии АП (ПВП, ПЭГ, плюроники) наблюдается рост фотокаталитической активности порфириновых ФС – димегина, фотодитазина и других ФС в реакции фотоокисления триптофана, что связано с образованием слабосвязанных нестехиометрических комплексов ФС-АП и разагрегацией молекул ФС [8].

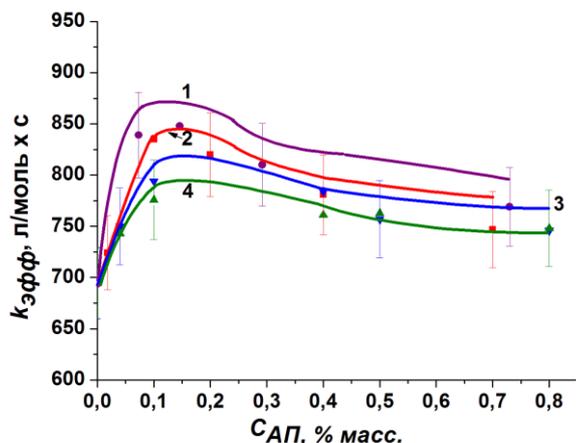


Рисунок 4. Зависимости эффективной константы скорости ($k_{эфф}$) реакции фотоокисления триптофана (1×10^{-4} М) в присутствии БР (2×10^{-6} М) от концентрации АП: плюроник F108 (1), плюроник F127 (2), ПЭГ (3) и ПВП (4)

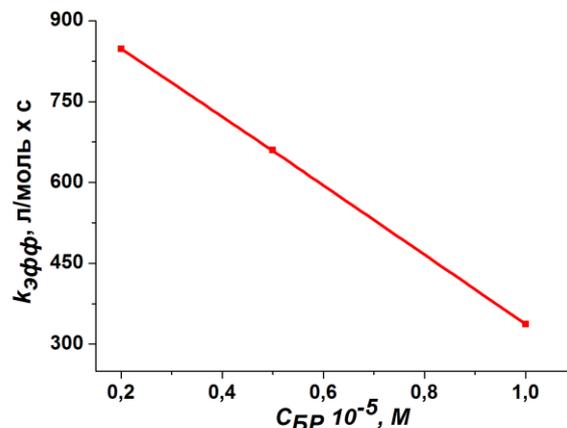


Рисунок 5. Зависимость $k_{эфф}$ реакции фотоокисления ТРП (1×10^{-4} М), катализируемой БР в присутствии F108 (0,1 % масс.) от концентрации БР

На рисунке 4 приведены зависимости эффективной константы скорости ($k_{эфф}$) фотоокисления триптофана (ТРП) в присутствии БР от концентрации АП. Видно, что при концентрации БР 2×10^{-6} М величина $k_{эфф}$ в присутствии всех АП возрастает, причем зависимость $k_{эфф} = f(C_{АП})$ носит экстремальный характер. Важно отметить, что, как следует из рисунка 5, влияние АП – плюроника F108 на величину $k_{эфф}$ снижается с ростом концентрации красителя, что вызвано, очевидно, образованием все более прочно связанных агрегатов. Во всех случаях наибольшее влияние на фотосенсибилизирующую активность БР оказывают плюроник F108 (кривая 1), F127 (кривая 2) и ПЭГ (кривая 3) при концентрации 0,1 % масс. Дальнейшее повышение концентрации АП понижает величину $k_{эфф}$, что, вероятно, происходит из-за «неэффективного» связывания красителя и ТРП при увеличении содержания молекул полимеров в реакционном растворе. Другими словами, БР и триптофан могут локализоваться на удаленных друг от друга участках полимерных цепей или могут связываться с разными макромолекулами амфифильных полимеров в реакционной среде. ПВП практически не оказывает влияния на фотокаталитическую активность БР (рис. 4, кривая 4). Возможно, это связано с тем, что ПВП в воде имеет конформацию макромолекулярного клубка. Скорее всего и краситель, и ТРП связываются с разными фрагментами макромолекул ПВП, что, вследствие малого времени жизни синглетного кислорода в водных средах, ведет к снижению $k_{эфф}$.

3.2.1. Влияние АП на ЭСП и спектры флуоресценции БР в воде

В ЭСП двойных систем БР-АП¹ наблюдаются батохромный сдвиг на 5 – 15 нм обеих полос поглощения БР ($\lambda = 550$ и 515 нм соответственно) и рост оптической плотности

¹ Характер изменений ЭСП и спектра флуоресценции БР в присутствии АП не меняется с ростом концентрации красителя до 1×10^{-5} М при концентрации [АП]=0,1 % масс.

основной (относящейся к мономерным формам БР) полосы поглощения красителя при длине волны 550 нм (рис. 6 а). Кроме того, при добавлении АП наблюдается рост интенсивности полосы флуоресценции красителя в 2 – 5 раз (рис. 6 б). Наблюдаемые закономерности свидетельствуют о том, что между макромолекулами АП и функциональными группировками красителя возникают гидрофобные, водородные, донорно-акцепторные связи, что приводит к агрегации ассоциатов молекул красителя. Как следует из рисунка 6 а и б, наибольшее влияние и на ЭСП, и на спектр флуоресценции бенгальского розового оказывает ПВП (кривая 5). Это говорит о достаточно сильном взаимодействии между БР и ПВП, что, возможно, связано с наличием в структуре полимера и красителя выраженных гидрофобных фрагментов.

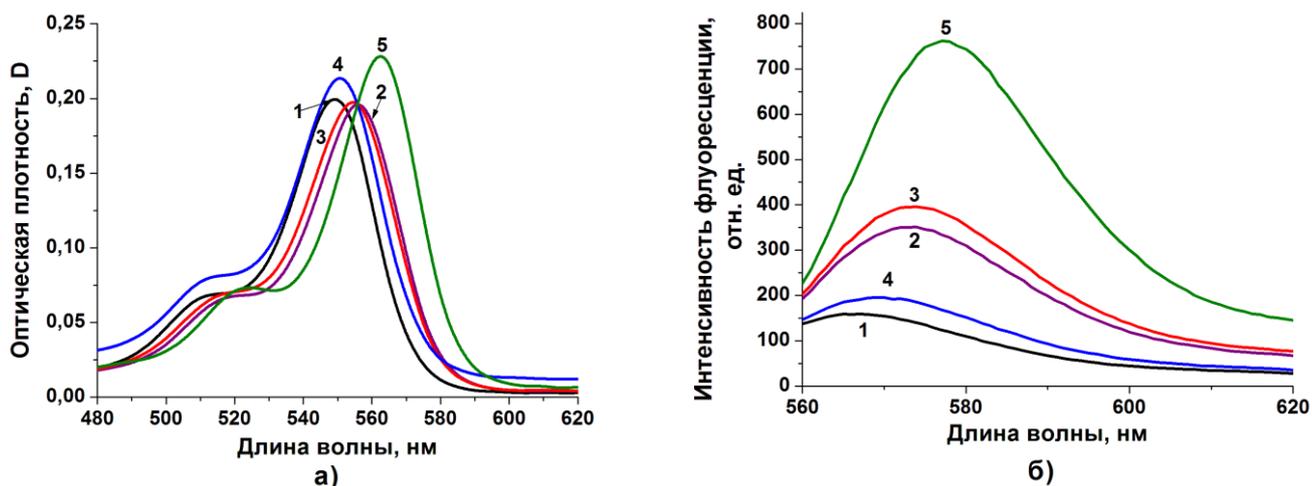


Рисунок 6. а) ЭСП и б) спектры флуоресценции БР (1) и систем БР-АП. В качестве АП взяты плюроники F108 (2), F127 (3), ПЭГ (4) и ПВП (5). $[BR] = 2 \times 10^{-6}$ М, концентрации полимеров – 0,1 % масс.

На рисунке 7 представлены зависимости интенсивности флуоресценции (I) бенгальского розового ($C = 2 \times 10^{-6}$ М) от концентрации АП². Как следовало из спектров флуоресценции, приведенных на рисунке 6 б, в присутствии АП наблюдается рост величины I красителя, причем наибольший рост интенсивности флуоресценции БР наблюдался в присутствии ПВП. Как видно из рисунка 7, уже при низкой ($\sim 0,04$ % масс.) концентрации ПВП в растворе интенсивность флуоресценции БР увеличивается в $\sim 4,5$ раза (кривая 4), достигая своего максимального значения по сравнению с величиной I чистого БР ($I = 200$ отн. ед.).

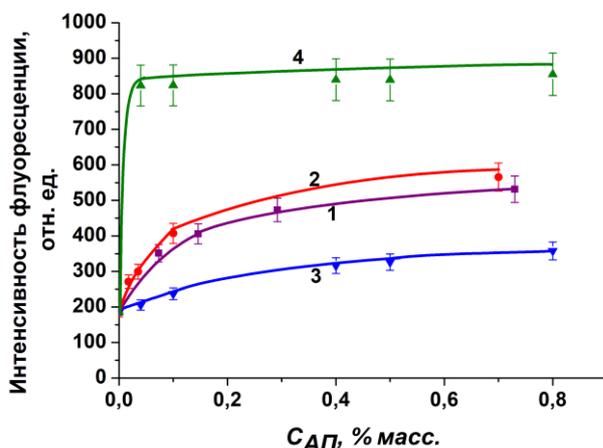


Рисунок 7. Зависимости интенсивности флуоресценции (I) БР (2×10^{-6} М) от концентрации АП: плюроник F108 (1), плюроник F127 (2), ПЭГ (3), ПВП (4)

² Для систем БР-АП при концентрациях красителя 5×10^{-6} М и 1×10^{-5} М были получены аналогичные зависимости I от концентрации АП.

В то же время максимальный рост I БР в присутствии плуроников наблюдается при концентрациях полимера $\sim 0,7$ %, т.е. более чем в 20 раз превышающих содержание ПВП (рис. 7, кривые 1, 2). При этом величина эффекта в присутствии плуроников существенно меньше. Наименьшее влияние на I закономерно оказывает ПЭГ (рис. 7, кривая 3) – наиболее гидрофильный из использованных АП. Таким образом, в водных растворах БР образует наиболее прочные связи с ПВП.

3.2.2. Соотношение мономерных – димерных форм БР в отсутствии и в присутствии АП

Разагрегирование надмолекулярных образований БР в присутствии АП подтверждается также изменением содержания димерных и мономерных форм БР в воде с ростом концентрации АП, которое можно определить по соотношению φ оптических плотностей полос с $\lambda = 550$ и 515 нм ($\varphi = D_{max}/D_{плечо}$), в присутствии АП. На рисунке 8 представлены зависимости $D_{max}/D_{плечо}$ при $[БР]=5 \times 10^{-6}$ М от концентрации АП. Величина φ для исходного БР составляет $\sim 3,1$. Для систем БР-АП, где концентрация полимеров составляла 0,1 % масс., величина $D_{max}/D_{плечо}$ увеличивается до $\sim 3,5$, что указывает на смещение равновесия «мономер \leftrightarrow димер» в сторону мономерных форм БР. Величина φ остается практически неизменной при дальнейшем увеличении содержания полимеров в системе БР-АП, что свидетельствует о сохранении равновесия «мономер \leftrightarrow димер» даже в присутствии избытка АП. Данные рисунка 8 подтверждают вывод о том, что между макромолекулами ПВП и БР наблюдается наиболее сильное взаимодействие (по сравнению с другими системами БР-АП). Видно, что в присутствии ПВП существенно увеличивается содержание мономерной формы БР (кривая 4).

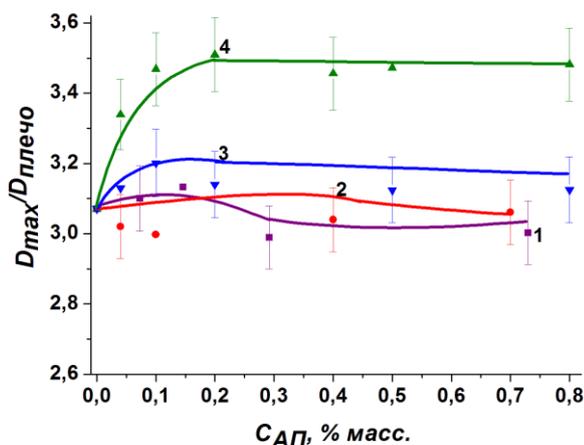


Рисунок 8. Зависимости $\varphi = D_{max}/D_{плечо}$ при $[БР] = 2 \times 10^{-6}$ М от концентрации АП: плуроник F108 (1), плуроник F127 (2), ПЭГ (3), ПВП (4)

3.3. ПМР спектры раствора БР и ПВП

Наличие взаимодействия между БР и ПВП обнаруживается также при исследовании ПМР спектров этих систем с использованием метода 1H - 1H NOESY в дейтерированном водном растворе БР и ПВП (массовое соотношение 1:1). Оказалось, что для сигналов протонов ПВП, помимо уширения в присутствии БР, наблюдается смещение в сторону сильных полей на 0,2 м. д., что характерно для случая, когда происходит частичное сближение протонов ПВП с системой ароматических колец молекул БР.

Таким образом, данные, полученные с помощью спектральных методов исследования (ЭСП, спектры флуоресценции, ЯМР), свидетельствуют о наличии взаимодействия между БР и АП и образовании слабосвязанного нестехиометрического комплекса БР-АП, что приводит к росту эффективной константы скорости $k_{эфф}$ фотоокисления триптофана.

Глава 4. ВЛИЯНИЕ АМФИФИЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ НА ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ТРИПТОФАНА

В литературном обзоре было отмечено, что метиленовый синий так же, как и бенгальский розовый, склонен в воде к самоорганизации с образованием димеров и более крупных агломератов, что проявляется в виде изменения фотосенсибилизирующих и спектральных свойств МС [6].

4.1. Фотокаталитическая активность метиленового синего в воде

На рисунке 9 представлена зависимость эффективной константы скорости $k_{эфф}$ окисления триптофана от концентрации МС в воде. Как следует из представленной зависимости, повышение концентрации красителя в водном растворе приводит к падению величины $k_{эфф}$, что связано с процессом агрегации молекул метиленового синего при увеличении его содержания в растворе.

Следует отметить, что фотосенсибилизирующая активность МС в реакции окисления субстрата и его спектральные свойства исследованы только в водных растворах, поскольку метиленовый синий практически не растворим в фосфатно-буферном растворе.

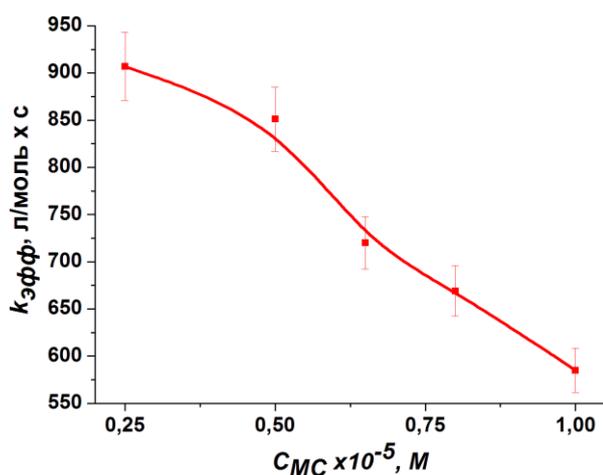


Рисунок 9. Зависимость эффективной константы скорости $k_{эфф}$ фотоокисления триптофана ($1,5 \times 10^{-5} M$) от концентрации метиленового синего

4.1.1. Спектральные свойства МС

На рисунке 10 представлены ЭСП (а) и спектры флуоресценции (б) МС в воде при разных концентрациях красителя. Как следует из рисунка 10 а, в спектре поглощения МС присутствует довольно интенсивная ($\epsilon \sim 6,5 \times 10^4 M^{-1} \cdot cm^{-1}$) асимметричная полоса поглощения с основным пиком $\lambda = 665$ нм (D_{max}), соответствующая мономерной форме красителя, и небольшое плечо в области $\lambda = 610 - 615$ нм ($D_{плечо}$), которое относят к димерной форме красителя. Видно, что с увеличением концентрации МС растет значение оптической плотности обеих полос поглощения в ЭСП красителя, что говорит о росте содержания как мономерной МС, так и димерной формы метиленового синего. Однако при этом равновесие $мономер \rightleftharpoons димер$ сдвигается вправо (рис. 10 а). Об этом свидетельствует падение величины φ ($\varphi = D_{max}/D_{плечо}$, где D_{max} – оптическая плотность полосы с $\lambda = 665$ нм, $D_{плечо}$ – оптическая плотность полосы с $\lambda = 610 - 615$ нм) с ростом концентрации МС в растворе (таблица 1). В спектре флуоресценции МС с увеличением концентрации красителя с $2,5 \times 10^{-6} M$ до $1 \times 10^{-5} M$ наблюдаются рост интенсивности и батохромный сдвиг полосы флуоресценции ($\lambda = 682$ нм) красителя (рис. 10 б, кривые 1 – 3), что также свидетельствует о димеризации молекул МС. При дальнейшем повышении концентрации АК наблюдается концентрационное тушение флуоресценции МС (рис. 10 б, кривая 4), что связано с образованием, вероятно, более

крупных ассоциатов молекул флуорофора. Таким образом, повышение концентрации МС в воде приводит к сдвигу равновесия $\text{мономер} \rightleftharpoons \text{димер}$ в сторону увеличения содержания димерных форм красителя. В связи с этим спектральные и кинетические исследования были проведены при минимальной концентрации МС – $2,5 \times 10^{-6}$ М.

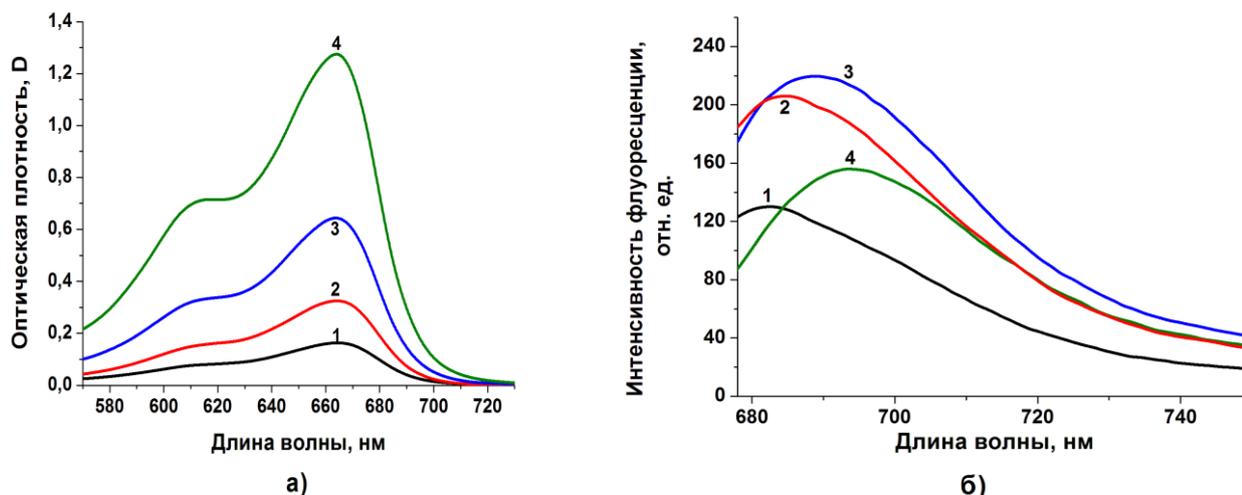


Рисунок 10. а) ЭСП и б) спектры флуоресценции МС при концентрациях $2,5 \times 10^{-6}$ М (1), 5×10^{-6} М (2), 1×10^{-5} М (3) и 2×10^{-5} М (4)

Таблица 1. Соотношение $\varphi = D_{\max}/D_{\text{плечо}}$ при разных концентрациях МС

Концентрация МС, М	$D_{\max}/D_{\text{плечо}}$
$2,5 \times 10^{-6}$	$1,99 \pm 0,05$
5×10^{-6}	$1,96 \pm 0,02$
1×10^{-5}	$1,92 \pm 0,01$
2×10^{-5}	$1,80 \pm 0,01$

4.2. Особенности фотокаталитической активности метиленового синего в присутствии амфифильных полимеров

На рисунке 11 приведены зависимости $k_{\text{эфф}}$ реакции фотоокисления ТРП, катализируемой системой МС-АП, от концентрации полимеров. Видно, что амфифильные полимеры повышают фотокаталитическую активность красителя, что отражается в росте эффективной константы скорости фотоокисления $k_{\text{эфф}}$, причем зависимость $k_{\text{эфф}} = f(C_{\text{АП}})$ для системы МС-плюроники описывается кривыми с насыщением (рис. 11, кривые 1, 2). Для систем МС-ПВП и МС-ПЭГ при повышении концентрации АП наблюдается экстремальный ход зависимости $k_{\text{эфф}} = f(C_{\text{АП}})$. Разный ход зависимостей для мицеллообразующих (плюроники F127, F108; рис. 11, кривые 1, 2) и мицелло-необразующих полимеров (ПВП, ПЭГ; рис. 11, кривые 3, 4) связан с разным характером взаимодействия красителя с этими группами полимеров. МС в силу достаточной полярности при солубилизации плюрониками локализуется, очевидно, в гидрофильной «опушке» полимера, где, как было показано ранее, присутствуют солубилизованные молекулы триптофана [14]. С ростом концентрации плюроника происходит агрегация молекулярных ассоциатов МС, что также приводит к росту эффективной константы скорости фотоокисления триптофана, причем «запределевание» зависимости $k_{\text{эфф}} = f(C_{\text{АП}})$ может свидетельствовать о максимальной степени агрегации МС в присутствии плюроников. В присутствии ПВП и ПЭГ значение $k_{\text{эфф}}$ увеличивается больше, чем в присутствии плюроников, т. е. основной вклад в эффект повышения скорости процесса вносит характер связывания (прочность, степень агрегирования, локализация вблизи молекул субстрата) АК макромолекулами АП. Экстремальный характер кривых $k_{\text{эфф}} = f(C_{\text{АП}})$ для ПВП и ПЭГ связан, очевидно, с возрастанием степени неэффективной адсорбции красителя (разные фрагменты

макромолекул, сорбирующих МС и ТРП) при росте концентрации полимера в воде, причем полимер в этом случае играет роль «разбавителя» системы, препятствующего контактам МС и триптофана. Ввиду малого времени жизни 1O_2 в водных растворах это приводит к падению величины $k_{эфф}$.

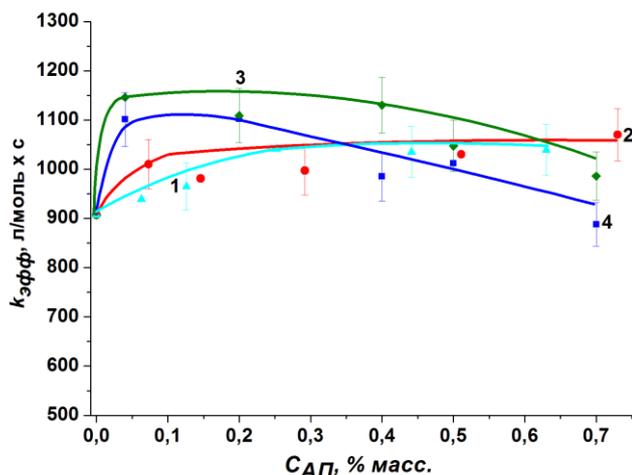


Рисунок 11. Зависимости $k_{эфф}$ фотоокисления триптофана ($1,5 \times 10^{-5}$ М) в присутствии МС ($2,5 \times 10^{-6}$ М) и АП от концентрации амфифильных полимеров F127 (1), F108 (2), ПЭГ (3) и ПВП (4)

4.2.1. Влияние АП на ЭСП и спектры флуоресценции МС

Следует отметить также, что при добавлении АП в водный раствор МС наблюдаются небольшой рост оптической плотности обеих полос поглощения ($\lambda = 665$ нм и 620 нм) в ЭСП красителя и рост интенсивности флуоресценции МС (таблица 2). Причем наибольший рост оптической плотности и интенсивности флуоресценции МС наблюдается в присутствии ПВП и ПЭГ, что соответствует вышеприведенным кинетическим данным и свидетельствует о наибольшей разагрегации МС в присутствии этих полимеров.

Таблица 2. Влияние АП на спектры поглощения и флуоресценции МС в воде

Образец	Оптическая плотность		$D_{max}/D_{плечо}$	Интенсивность флуоресценции, отн. ед.
	$D_{665\text{нм}} (D_{max})$	$D_{620\text{нм}} (D_{плечо})$	φ	I
МС	0,162	0,080	2,02	141
МС-ПВП	0,180	0,087	2,07	164
МС-ПЭГ	0,176	0,086	2,04	157
МС-F108	0,170	0,086	1,98	146
МС-F127	0,168	0,085	1,98	146

$[МС] = 2,5 \times 10^{-6}$ М, $[F127] = 0,63$ % масс., $[F108] = 0,73$ % масс., $[ПВП] = 0,7$ % масс., $[ПЭГ] = 0,7$ % масс.

Как следует из таблицы 2, величина φ практически не меняется в присутствии АП, даже при высоких концентрациях полимеров.

4.3. ^1H -ЯМР спектроскопия МС, ПВП и системы МС-ПВП

Для подтверждения возможного взаимодействия красителя с АП были изучены ^1H -ЯМР спектры МС, поливинилпирролидона и их смеси (соотношение 1:1 по массе) в D_2O . Показано, что в системе МС-ПВП (по сравнению с исходными компонентами) наблюдаются сдвиги сигналов протонов как у молекул красителя, так и у макромолекул поливинилпирролидона. В частности, сигналы протонов ароматического кольца метиленового синего в присутствии ПВП сдвигаются в слабое поле на 0,1 – 0,13 м. д. Одновременно наблюдаются сдвиги протонов винильных и пирролидоновых фрагментов ПВП в сильное поле на 0,1 – 0,13 м. д., попадая под влияние ароматических колец МС. Такие «согласованные изменения» в ПМР спектрах МС и ПВП (по сравнению со спектрами индивидуальных компонентов) в их совместном растворе могут свидетельствовать о

существовании слабых взаимодействий между гидрофобными группировками молекул красителя и амфифильного полимера.

Таким образом, вышеприведенные результаты свидетельствуют о том, что в водной фазе ПВП и ПЭГ взаимодействуют с МС, образуя слабосвязанные нестехиометрические комплексы. Такое взаимодействие приводит к агрегации молекул красителя, что отражается в увеличении фотосенсибилизирующей активности метиленового синего. При этом наблюдаются небольшие химические сдвиги полос в ^1H -ЯМР спектрах, а также рост оптической плотности полос поглощения и интенсивности флуоресценции МС в присутствии АП.

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ НА ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ АНТРАЦЕНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С АМФИФИЛЬНЫМИ ПОЛИМЕРАМИ

Как было уже упомянуто, эффективность лечения методом АФДТ локальных инфекционных процессов (раны, ожоги, трофические язвы) с использованием комплексов антраценовых красителей – бенгальского розового и метиленового синего с амфифильными полимерами в качестве ФС, возможно повысить, если одновременно использовать биологически активные полисахариды – хитозан и альгинат натрия, обладающие ранозаживляющими свойствами. При этом важно, чтобы полисахариды не снижали активность красителей в фотогенерации синглетного кислорода – основного активного реагента в методе АФДТ. В данной главе представлены результаты исследования влияния указанных ПС на эффективную константу скорости фотосенсиблизованного окисления триптофана в присутствии АК и систем АК-АП.

5.1. Влияние полисахаридов на фотокаталитическую активность АК

5.1.1. Фотокаталитическая активность системы БР-ХТЗ в PBS

На рисунке 12 приведены зависимости эффективной константы скорости $k_{эфф}$ реакции фотоокисления триптофана в присутствии БР (2×10^{-6} М и 5×10^{-6} М) от концентрации хитозана (кривые 1 и 2 соответственно). Видно, что хитозан уже при минимальной концентрации в растворе (5×10^{-3} % масс.) понижает величину $k_{эфф}$ более чем в два раза, но последующее увеличение его содержания в растворе уже не влияет на величину константы скорости. Приведенные на рисунке 12 зависимости говорят о взаимодействии дианионов БР с протонированными аминогруппами хитозана. Наблюдаемая независимость содержания хитозана в смеси, при котором эффективная константа $k_{эфф}$ скорости фотоокисления становится минимальной, от используемой концентрации БР связана, очевидно, с достаточно большим избытком хитозана (3×10^{-4} М в расчете на звено хитозана) по отношению к БР в реакционной системе.

В связи с этим дальнейшие кинетические и спектральные исследования, связанные с бенгальским розовым, проводили при концентрации хитозана 5×10^{-3} % масс.

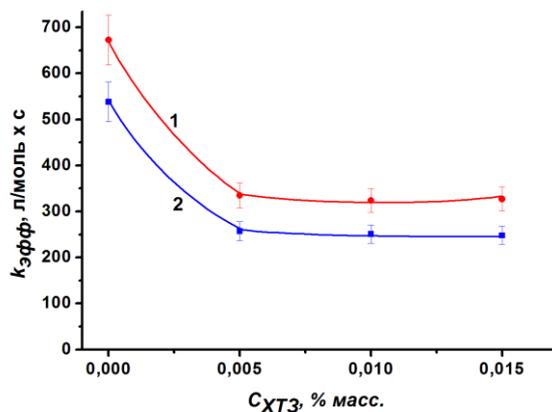


Рисунок 12. Зависимости $k_{эфф}$ фотоокисления триптофана в присутствии бенгальского розового в PBS среде от концентрации хитозана. $[BR] = 2 \times 10^{-6}$ М (1) и 5×10^{-6} М (2), $[TRP] = 1 \times 10^{-4}$ М

5.1.2. Влияние АН на фотокаталитическую активность МС в водном растворе

Зависимости $k_{эфф}$ фотоокисления триптофана в присутствии МС от концентрации АН имели сходный характер с вышеприведенными зависимостями для $k_{эфф}$ в присутствии БР и хитозана. Это следует из рисунка 13, на котором приведены зависимости $k_{эфф}$ фотоокисления триптофана в присутствии МС ($C = 2,5 \times 10^{-6}$ М и 5×10^{-6} М, кривые 1 и 2 соответственно) от концентрации АН. Видно, что в присутствии $2,5 \times 10^{-3}$ % масс. альгината натрия величина эффективной константы скорости $k_{эфф}$ падает в 1,5 – 3,5 раза. Дальнейшее повышение концентрации альгината натрия практически не влияет на величину $k_{эфф}$. Наблюдаемые зависимости также свидетельствуют об ионном взаимодействии положительно заряженного красителя с анионным полисахаридом.

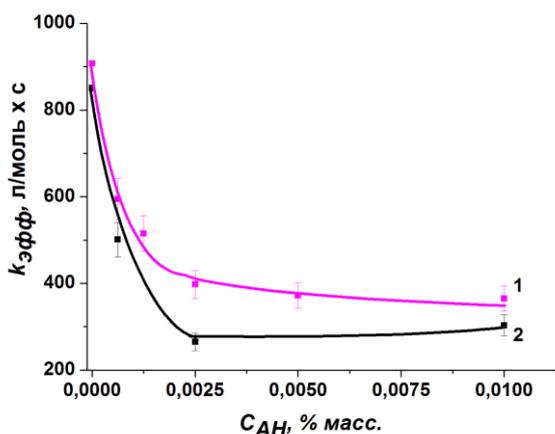


Рисунок 13. Зависимости эффективной константы скорости $k_{эфф}$ фотоокисления триптофана ($1,5 \times 10^{-5}$ М) в присутствии МС ($2,5 \times 10^{-6}$ М) (1) и (5×10^{-6} М) (2) от концентрации альгината натрия

5.2. Фотосенсибилизирующая активность систем АК-АП-ПС

Однако связывание АК с макромолекулами полисахаридов можно предотвратить, вводя в систему амфифильные полимеры. Как следует из рисунка 14, АП практически полностью блокируют ионное взаимодействие БР с ХТЗ и восстанавливают фотокаталитическую активность бенгальского розового. При добавлении ПВП с концентрацией 0,5 – 0,7 % масс. в систему БР-ХТЗ величина $k_{эфф}$ тройной системы БР-ПВП-ХТЗ практически совпадает с величиной $k_{эфф}$ исходного БР (рис. 14, синяя точка). Возможно, в слабокислом растворе хитозана протонированные аминогруппы полисахарида взаимодействуют с карбонильными группами пирролидинового цикла, оставляя свободными молекулы БР. Об этом говорит тот факт, что ПВП не повышает $k_{эфф}$ окисления триптофана в присутствии ХТЗ выше чем $k_{эфф}$ в присутствии исходного БР.

Аналогичные закономерности наблюдаются при введении амфифильных полимеров в систему МС-АН. На рисунке 15 представлены зависимости $k_{эфф}$ реакции фотоокисления

триптофана, катализируемой системами МС-АП-АН, от концентрации АП. Видно, что при добавлении ПВП и ПЭГ в раствор, содержащий МС и АН, наблюдаются рост и практически полное восстановление исходной фотокаталитической активности красителя (рис. 15, кривые 1, 2). В то же время введение плуроника F108 в систему МС-АН лишь незначительно повышает величину константы скорости (рис. 15, кривая 3). Возможно, более эффективное «экранирование» полиэтиленоксидом молекул МС от взаимодействия с АН по сравнению с плуроником связано с донорно-акцепторным межмолекулярным взаимодействием ПЭГ и АН.

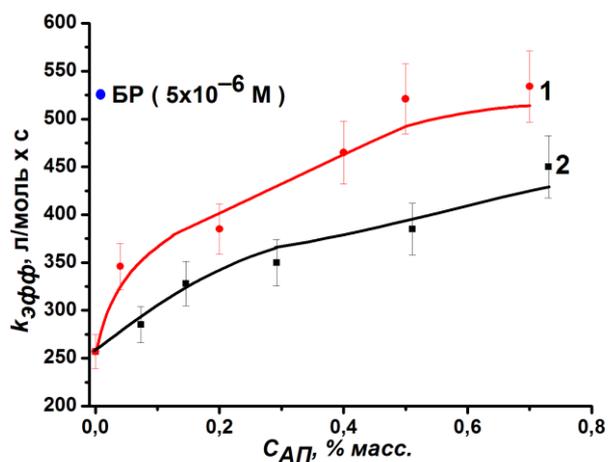


Рисунок 14. Зависимости $k_{эфф}$ фотоокисления ТРП (1×10^{-4} М) в присутствии БР (5×10^{-6} М) и ХТЗ (0,005 % масс.) при добавлении ПВП (1) и плуроника F108 (2) от концентрации полимеров: [АП] = 0 – 0,8 % масс. Краситель и АП были растворены в PBS среде. Синяя точка – $k_{эфф}$ в присутствии [БР] = 5×10^{-6} М

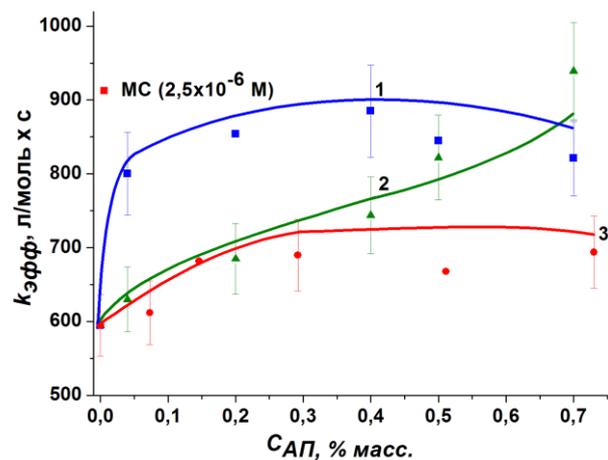


Рисунок 15. Зависимости эффективной константы скорости $k_{эфф}$ фотоокисления триптофана ($1,5 \times 10^{-5}$ М) в присутствии МС ($2,5 \times 10^{-6}$ М) и АН (0,000625 % масс.) при добавлении ПВП (1), ПЭГ (2) и F108 (3). [АП] = 0 – 0,73 % масс. Красная точка – $k_{эфф}$ в присутствии [МС] = $2,5 \times 10^{-6}$ М

5.3. Влияние АП на спектры поглощения и флуоресценции АК-ПС

5.3.1. ЭСП и спектры флуоресценции БР-ХТЗ и БР-АП-ХТЗ в PBS

Следует отметить, что взаимодействие АК с полисахаридами и амфифильными полимерами закономерно влияет на интенсивность полос и положение в электронных спектрах поглощения и спектрах флуоресценции красителей.

Так, в присутствии ХТЗ наблюдается падение в 1,5 – 2 раза оптической плотности полос поглощения красителя и интенсивности люминесценции БР в буферном растворе (рис. 16, кривые 1, 2), связанное с электростатическим взаимодействием поликатионного ХТЗ с анионным БР. При этом положение полос поглощения и флуоресценции в спектрах не меняется, что говорит об отсутствии гидрофобных межмолекулярных взаимодействий функциональных групп молекулы красителя – флуорофора с фрагментами полисахаридных макромолекул [15].

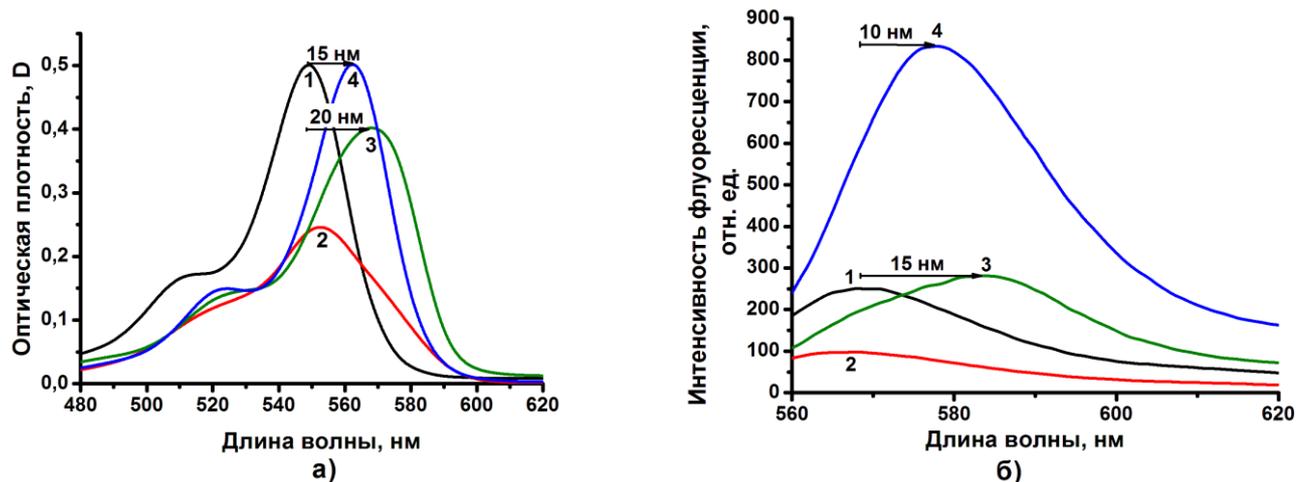


Рисунок 16. а) ЭСП и б) спектры флуоресценции [БР] в PBS. БР = 5×10^{-6} М (1), БР-ХТЗ (2), БР-F108-ХТЗ (3), БР-ПВП-ХТЗ (4), где [F108] = 0,73 % масс., [ПВП] = 0,2 % масс. и [ХТЗ] = 0,005 % масс.

В то же время введение амфифильных полимеров в растворы, содержащие БР и хитозан, вызывает батохромный сдвиг полос поглощения в ЭСП и спектрах флуоресценции систем БР-АП-ХТЗ. В частности, как следует из рисунка 16 а, при добавлении плуроника F108 и ПВП в систему БР-ХТЗ наблюдается батохромный сдвиг (по сравнению с положением полосы поглощения БР в PBS, кривая 1) полос поглощения БР на 15 нм (кривая 4) и 20 нм (кривая 3) для систем БР-АП-ХТЗ, где АП – F108 и ПВП соответственно. В то же время в присутствии АП и ХТЗ (рис. 16 б, кривые 3 и 4 соответственно) наблюдаются значительный рост интенсивности флуоресценции БР по сравнению с исходным БР (рис. 16 б, кривая 1) и батохромный сдвиг полос флуоресценции красителя на 10 – 15 нм. Полученные спектральные данные говорят не только об «экранировании» молекул БР от взаимодействия с ХТЗ, но и о агрегации надмолекулярных образований красителя в присутствии АП.

5.3.2. Спектральные свойства систем МС-АН и МС-АП-АН в воде

Ионное взаимодействие между метиленовым синим и альгинатом натрия отражается также в ЭСП и спектрах флуоресценции красителя.

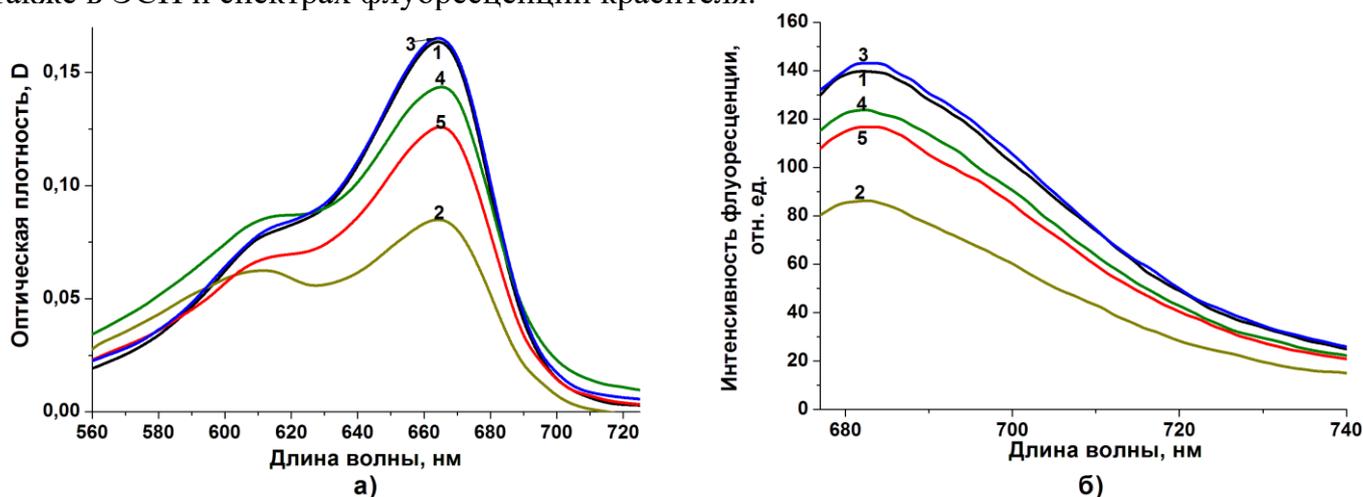


Рисунок 17. а) ЭСП и б) спектры флуоресценции МС ($2,5 \times 10^{-6}$ М) в воде (1), МС-АН (2), МС-ПВП-АН (3), МС-ПЭГ-АН (4), МС-F108-АН (5), где [F108] = 0,73 % масс., [ПВП и ПЭГ] = 0,7 % масс. и [АН] = 0,000625 % масс.

Как следует из рисунка 17 а и б, оптическая плотность обеих полос поглощения и интенсивность флуоресценции МС в присутствии АН падают на ~ 50 % по сравнению с ЭСП и спектром флуоресценции чистого метиленового синего (кривые 1 и 2 соответственно). При

добавлении АП в двойную систему МС-АН наблюдается рост оптической плотности полос поглощения и интенсивности флуоресценции МС (кривые 3 – 5). При этом в присутствии ПВП наблюдается рост величин D и интенсивности I флуоресценции до величин D и I , регистрируемых в отсутствие АН (кривые 1 и 3). В то же время увеличение содержания ПЭГ и плуроника F108 в системе МС-АП-АН не позволяет восстановить исходную оптическую плотность и интенсивность флуоресценции МС (кривые 4 и 5 соответственно), т.е. часть молекул МС остается связанной с АН, что, возможно, связано с разным характером взаимодействия МС с ПВП (гидрофобно-гидрофильным) по сравнению с более гидрофильными ПЭГом и плуроником F108.

5.4. Влияние полимеров на степень анизотропии флуоресценции АК

Для выявления особенностей межмолекулярных взаимодействий антраценовых красителей с полимерами разной химической природы – амфифильными полимерами и полисахаридами в водных/буферных растворах было изучено влияние АП и ПС на величину степени анизотропии флуоресценции БР и МС (таблицы 3 и 4).

Из таблицы 3 следует, что анизотропия флуоресценции (r) чистого бенгальского розового в водном и PBS растворе составляет 0,26-0,27. В системах БР-АП в воде и PBS наблюдается рост анизотропии флуоресценции красителя, прежде всего в растворах с ПВП, что свидетельствует о наличии заметного взаимодействия АК с поливинилпирролидоном. Добавление ХТЗ в водный и буферный раствор БР по-разному влияет на величину r . Как видно, значение r в PBS растворе практически не меняется в присутствии полисахарида. В водном растворе в присутствии хитозана благодаря ионным взаимодействиям с протонированными аминогруппами полисахарида свобода вращения флуорофора уменьшается, что ведет к повышению анизотропии флуоресценции БР. При добавлении F108 и ПВП к водному раствору БР и хитозана с $r = 0,32$ анизотропия падает в 1,3-3,0 раза. Очевидно, АП, взаимодействуя с красителем, обеспечивают БР большую подвижность благодаря разрыву ионных связей с хитозаном. Важно отметить, что снижение анизотропии флуоресценции в присутствии АП в системах БР-АП-ХТЗ происходит в основном в присутствии мицеллообразующего плуроника F108, для ПВП этот эффект не так выражен.

Таблица 3. Анизотропия флуоресценции (r) БР в отсутствие и присутствии АП и хитозана. Длина волны возбуждения 555 нм

Образец	r образцов в водном растворе (585 нм)	r образцов в PBS растворе (585 нм)
БР	0,26 ± 0,01	0,27 ± 0,01
БР+ПВП	0,31 ± 0,01	0,31 ± 0,01
БР+F108	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,01
БР+ХТЗ	0,32 ± 0,01	0,28 ± 0,01
БР+ПВП+ХТЗ	0,23 ± 0,01	0,31 ± 0,01
БР+F108+ХТЗ	0,09 ± 0,01	0,23 ± 0,01

[БР] = 5×10^{-6} М, [ХТЗ] = 0,005 % масс., [F108] = 0,15 % масс., [ПВП] = 0,2 % масс.

Степень поляризации МС, как следует из таблицы 4, в исходном водном растворе составляет $r = 0,087$. В присутствии АП значение r для красителя несколько увеличивается (до 0,098). Альгинат натрия повышает анизотропию до 0,103, концентрация АН при этом составляет $6,25 \times 10^{-4}$ % масс. Рост степени поляризации обусловлен взаимодействием функциональных групп флуорофора с фрагментами структуры полимеров, что приводит к ограничению свободы движения МС в водном растворе и росту величины r . При этом с амфифильными полимерами это могут быть гидрофобные взаимодействия, а в случае альгината натрия – более сильные, ионные, что приводит в случае системы МС-АН к

большему повышению величины анизотропии флуоресценции красителя. В трехкомпонентных системах МС-АП-АН значения степени поляризации ($r = 0,094 - 0,098$) близки к значениям r для двойных систем МС-АП ($r = 0,091 - 0,098$). Возможно, образующиеся слабосвязанные комплексы МС-АП частично препятствуют ионному связыванию катионного красителя с полианионным полисахаридом.

Таблица 4. Анизотропия флуоресценции МС, систем МС-АП, МС-АН и МС-АП-АН. Длина волны возбуждения $\lambda_{\text{воз}}=665$ нм

Образец	Анизотропия флуоресценции образцов в водном растворе (r) (685 нм)
МС	$0,087 \pm 0,003$
МС+ПВП	$0,091 \pm 0,002$
МС+F108	$0,098 \pm 0,004$
МС+ПЭГ	$0,097 \pm 0,002$
МС+АН	$0,103 \pm 0,003$
МС+ПВП+АН	$0,096 \pm 0,004$
МС+F108+АН	$0,098 \pm 0,003$
МС+ПЭГ+АН	$0,094 \pm 0,002$

[МС] = $2,5 \times 10^{-6}$ М, [ПВП и ПЭГ] = 0,7 % масс., [F108] = 0,73 % масс., [АН] = 0,000625 % масс.

5.4. Исследование структуры поверхности образцов АК, АК-АП, АК-ПС и АК-АП-ПС методом АСМ

Возможные взаимодействия полимеров с АК были исследованы также методом атомно-силовой микроскопии. Проведен АСМ анализ участков поверхности образцов, получаемых при испарении водных растворов, содержащих АК, АП и ПС, а также их смеси на слюде (рис. 18 и 19).

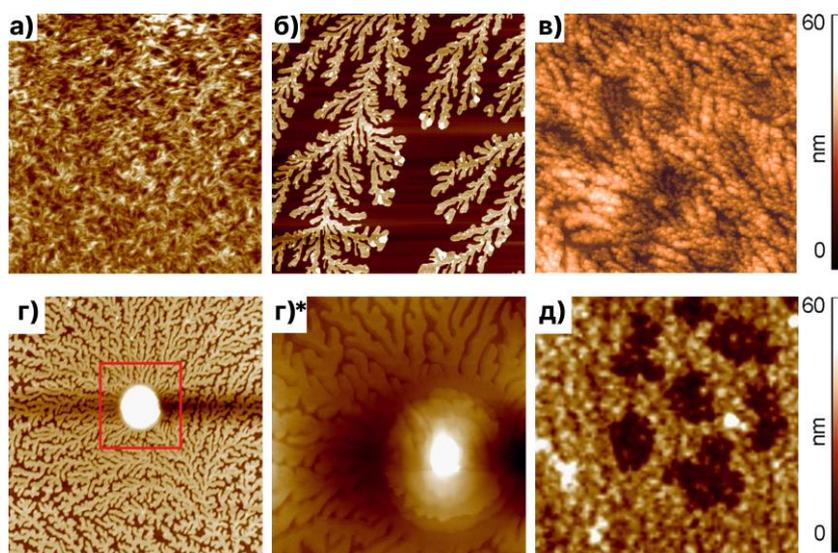


Рисунок 18. АСМ – изображения участков поверхности образцов БР (1×10^{-3} М) (а), F108 (0,073 % масс.) (б), ХТЗ (0,005 % масс.) (в), БР-F108 (г и г*) и БР-F108-ХТЗ (д) в режиме топографии. Размер изображений составлял 10×10 мкм для а – д и 3×3 мкм для г*. Концентрации веществ в системах: [БР] = 5×10^{-6} М, [F108] = 0,073 % масс., [ХТЗ] = 0,005 % масс.

Из рисунка 18 а видно, что структура поверхности исходного образца БР представлена вытянутыми разнонаправленными палочкообразными образованиями. Плюроник F108 и хитозан образуют на поверхности слюды дендритоподобные структуры (рис. 18 б, в) [16]. Для полисахарида наблюдается более плотная укладка дендритов с мелкозернистой структурой. В присутствии БР наблюдаются значительные изменения поверхностной структуры плюроника (рис. 18 г, г*). На поверхности плюроника фиксируются выпуклые образования сферической формы. Видна слоистая структура нового образования, что, возможно, отражает образование

агломератов БР-F108. При введении хитозана в двухкомпонентную систему БР-F108 структура поверхности образцов (тонких пленок) меняется (рис. 18 д) таким образом, что на мелкозернистой поверхности ХТЗ фиксируются ассоциаты БР-F108 в виде «островков» неправильной формы.

Структура поверхности исходного агрегированного МС (5×10^{-5} М) представлена сфероподобными частицами размером 70 – 110 нм (рис. 19 а), которые более четко видны на рисунке 19 б – изображении, полученном в режиме фазового контраста. На АСМ – изображении поверхности пленки АН (рис. 19 в, г) наблюдается характерная для этого полисахарида сетчатая структура, добавление МС не меняет структуру поверхности АН, образованной волокнами полимера с шарообразными включениями метиленового синего размерами ~ 100 нм (рис. 19 а). Для трехкомпонентной системы МС-F108-АН наблюдаются две отдельные фазы полимеров (рис. 19 д). Видно, что на альгинатной сетчатой подложке кристаллизуется плуроник F108 с характерной дендритоподобной структурой [16] и с включениями частиц МС. В то же время, как видно из рисунка 19 е (режим фазового контраста), на поверхности плуроника визуализируется сферическое образование размером ~ 500 нм в диаметре, которое, возможно, отвечает агломератам слабосвязанных комплексов плуроника F108 и красителя.

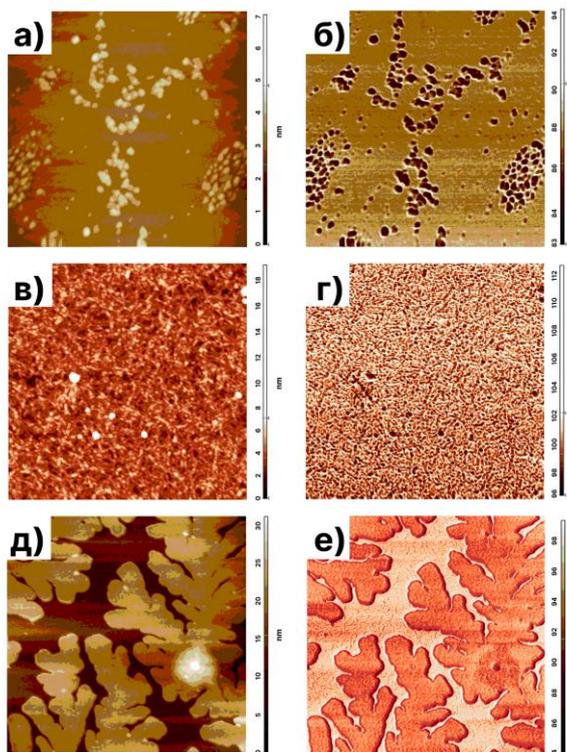


Рисунок 19. АСМ – изображения участков поверхности пленок МС (5×10^{-5} М) (а, б), МС-АН (в, г) и МС-F108-АН (д, е). Изображения а, в, д сделаны в режиме топографии; б, г, е – в режиме фазового контраста. Размер изображений составлял 3×3 мкм. Концентрации веществ в системах: $[МС] = 2,5 \times 10^{-6}$ М, $[F108] = 0,146$ % масс. и $[АН] = 0,005$ % масс.

Таким образом, в данной главе представлены закономерности влияния полисахаридов (ХТЗ, АН) и амфифильных полимеров (ПВП, ПЭГ, плуроник F108) на фотосенсибилизирующую активность АК в процессе генерации синглетного 1O_2 кислорода (в реакции окисления триптофана), а также на спектральные характеристики и поверхностную структуру красителей.

Показано, в частности, что ионное взаимодействие АК с ПС приводит к уменьшению величины $k_{эфф}$ и к падению оптической плотности полос поглощения в ЭСП и интенсивности флуоресценции красителей. Однако амфифильные полимеры, введенные в системы БР-ХТЗ и МС-АН, предотвращают связывание бенгальского розового и метиленового синего с полисахаридами, и фотокаталитическая активность АК восстанавливается. Образование комплекса АК-АП-ПС подтверждено методами электронной и флуоресцентной спектроскопии, а также при исследовании анизотропии флуоресценции красителя. Кроме

того, образование слабосвязанных комплексов БР-F108 и МС-F108 продемонстрировано при исследовании методом АСМ структуры поверхности пленок, полученных при испарении растворов, содержащих указанные красители и амфифильные полимеры.

Приложение 1.

Определение эффективности фотосенсибилизирующих систем БР-АП и МС-АП при лечении модельной полнослойной плоской кожной раны у лабораторных животных методом ФДТ

ФДТ исследования были выполнены на 65 крысах-самцах линии Вистар, разделенных на 13 групп в зависимости от способа обработки модельной раны в каждой группе (таблица 5). Создание модельной раны у лабораторных животных, порядок проведения ФДТ и гистологический анализ подробно описаны в диссертации.

Таблица 5. Распределение животных по группам

Группа	n	Средство обработки ран
№ 1 (к)	5	Без лечения – хлоргексидин
№ 2		БР
№ 3		БР+ hv
№ 4		БР-плюроник F108
№ 5		БР-плюроник F108 + hv
№ 6		БР-ПВП
№ 7		БР-ПВП + hv
№ 8		МС
№ 9		МС+ hv
№ 10		МС-плюроник F108
№ 11		МС-плюроник F108+ hv
№ 12		МС-ПВП
№ 13		МС-ПВП+ hv

[БР] = 2,5 мг/мл, [МС] = 1,25 мг/мл, [F108] = 20 мг/мл, [ПВП] = 5 мг/мл, к – контрольная группа, n – количество животных в группе

Экспериментальные группы № 1 – 4, 6, 8 – 10 и 12 служили контролем для основных опытных групп № 5, 7, 11 и 13. Задача контрольных исследований состояла в определении морфологических особенностей течения ранней фазы раневого процесса под влиянием каждого используемого агента ФДТ: отдельно красителей, БР и МС (группы № 2 и 8), сочетания их с лазерным облучением (группы № 3 и 9), полимеров, использованных в качестве основы-носителя для красителей - F108 и ПВП в отсутствие облучения (группы № 4, 6, 10 и 12).

Показано, что ФДТ с использованием в качестве ФС систем БР-F108 и МС-ПВП ликвидирует воспалительные и усиливает репаративные процессы в ране. В частности, при обработке раны системами БР-F108 и МС-ПВП с последующим облучением светом определенной длины волны, (530 нм для БР и 660 нм для МС) наблюдается образование непрерывного слоя грануляционной ткани с созреванием фибробластов и новообразованных сосудов (таблица 5, группы № 5 и 13).

Показано также, что при ФДТ с системами антраценовый краситель-амфифильный полимер, плюроник F108 и поливинилпирролидон способна существенно ослабить негативное воздействие БР и МС на микрососуды и полностью предотвратить развитие местной геморрагической реакции, осложняющей заживление раны при проведении сеансов ФДТ с использованием только МС и БР (таблица 5, группы № 3 и 9).

Таким образом, двухкомпонентные системы АК-АП являются эффективными ФС

препаратами, которые могут быть использованы при лечении гнойных ран методом ФДТ.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработаны новые фотосенсибилизирующие системы на основе антраценовых красителей – бенгальского розового и метиленового синего и амфифильных полимеров (ПВП, плуроник F108), обладающие высокой фотосенсибилизирующей активностью в генерации синглетного 1O_2 кислорода. Данные системы оказались также эффективны в *in vivo* исследованиях при лечении методом АФДТ полнослойной плоскостной раны у лабораторных животных.

2. С использованием метода 1H -ЯМР спектроскопии впервые показано наличие межмолекулярных взаимодействий в системе краситель-поливинилпирролидон, приводящих к разагрегированию ассоциатов АК, что определяет рост удельной фотосенсибилизирующей активности ФС.

3. Показано, что электростатические взаимодействия в системе краситель-полисахарид уменьшают фотосенсибилизирующую активность красителей в генерации 1O_2 . Так, активность БР падает в присутствии хитозана в 2 раза, а активность МС – в 1,5 – 3,5 раза в присутствии альгината натрия. Установлено, что введение АП в системы, содержащие краситель и полисахарид, приводит практически к полному восстановлению исходной активности красителей, что связано с блокировкой амфифильными полимерами взаимодействия БР-ХТЗ и МС-АН.

4. Показано, что в присутствии амфифильных полимеров и полисахаридов меняется степень анизотропии флуоресценции (r) красителей в водной и фосфатно-буферной среде (PBS), что свидетельствует о наличии межмолекулярных взаимодействий в системах краситель-полимер.

5. Методом атомно-силовой микроскопии показано, что молекулы АК (БР, МС) и макромолекулы плуроника F108 в растворе взаимодействуют друг с другом, что приводит к изменению надмолекулярной структуры полимера и выявляется при АСМ-анализе изображений участков поверхности тонких пленок, образующихся на слюдяной подложке при концентрировании и испарении водных растворов, содержащих указанные компоненты.

Список цитируемой литературы

1. Grzybowski A. and Turczynowska M. // *Asia-Pac J Ophthalmol.* – 2018. – V.7. – P. 72 – 75.
2. Alves E., Faustino M. A., Neves M. G. et al. // *Future Medicinal Chemistry.* – 2014. – V. 6, № 2. – P. 141 – 164.
3. Jia Q., Song Q., Li P. and Huang W. // *Adv. Healthcare Mater.* – 2019. – V. 8, № 14. – P. 1 – 19.
4. Кустов А. В., Березин Д. Б., Стрельников А. И., Лапочкина Н. П. / под научной редакцией профессора А. К. Гагуа. – Москва: Ларго, 2020. – 108 с.
5. Shen T., Zhao Z-G., Yu Q. and Xu H-J. // *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry.* – 1989. – V.47. – P. 203 – 212.
6. Tardivo J. P., Del Giglio A., de Oliveira C. S. et al. // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* – 2005. – V. 2. – P. 175 – 191.
7. Demartis S., Obinu A., Gavini E., Giunchedi P., Rassa G. // *Dyes and Pigments* – 2021. – V. 188. – 109236.
8. Горюх Ю. А., Аксенова Н. А., Соловьева А. Б. и др. // *ЖФХ* – 2011. – Т. 85, № 5. – С. 1 – 5.
9. Solovieva A. B., Tolstih P. I., Melik-Nubarov N. S. et al. // *Laser Phys.* – 2010. – V. 20, № 5. – P. 1068 – 1073.
10. Миронов А. Ф., Жданова К. А., Брагина Н. А. // *Успехи химии.* – 2018. – Т. 87, вып. 9. – С. 859 – 881.
11. Neo Y., Lee H. J., Kim E. H. et al. // *J Appl Polym Sci.* – 2014. – V. 131, № 14. – 40113;

12. Пат. 2609735 РФ. / Соловьёва А. Б., Аксенова Н. А., Спокойный А. Л. и др.; заявл. 09.12.2015; опублик. 02.02.2017.
13. Rudenko T. G., Shekhter A. B., Guller A. E. et al. // *Photochem Photobiol.* – 2014. – V. 90, № 6. – P. 1413 – 1422.
14. Соловьёва А. Б., Аксенова Н. А., Глаголев Н. Н., Мелик-Нубаров Н.С. и др.// *Химическая физика.* – 2012 – Т. 31, № 6. – С. 72 – 80.
15. Solovieva A. B., Kardumian V. V., Aksenova N. A. et al. // *Sci Rep.* – 2018. – V. 8, № 1. – 8042.
16. Kotova S.L., Timofeeva V.A., Belkova G.V. et al. // *Micron.* – 2012. – V. 43. – P. 445 – 449.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Kuryanova A. S.**, Solov'eva A. B., Glagolev N. N., Aksenova N. A., Timashev P. S. Effect of the Wavelength and Intensity of Excitation Light on the Efficiency of Photogeneration of Singlet Oxygen by Photodithazine in the Presence of Pluronic F127 in Model Processes of Photo-Oxidation// *Russian Journal of Physical Chemistry A* – 2021. – V. 95. – № 6. – P. 1222–1229. DOI: 10.1134/S0036024421060170.
2. Solov'eva A. B., Glagolev N. N., Aksenova N. A., **Kuryanova A. S.**, Vanin A. F., Timofeeva V.A., Timashev P. S. Dinitrosyl Iron Complexes in the Sensitized Oxidation of Organic Substrates // *Russian Journal of Physical Chemistry A* – 2019. – V. 93. – № 9. – P. 1834–1841. DOI: 10.1134/S0036024419090267.
3. Solov'eva A. B., **Kuryanova A. S.**, Savko M.A., Aksenova N. A., Afanas'evskaya E. V., Zolottsev V. A., Taratynova M. O., Ponomarev G. V., Timashev P. S. Photosensitizing Activity of Steroid Derivatives of Pyropheophorbide in the Oxidation of Tryptophan in the Aqueous Phase // *Russian Journal of Physical Chemistry A* – 2018. – V. 92. – № 9. – P. 1830–1836. DOI: 10.1134/S0036024418090261.
4. **Kuryanova A. S.**, Aksenova N. A., Savko, M. A., Glagolev N. N., Dubovik A. S., Plashchina I. G., Timashev P. S. and Solov'eva A. B. Effect of Amphiphilic Polymers on the Activity of Rose Bengal during the Photooxidation of Tryptophan in an Aqueous Medium // *Russian Journal of Physical Chemistry A* – 2022. – V. 91. – № 5. – P. 1106–1111. <https://doi.org/10.1134/S0036024422050168>.
5. **Kuryanova A.S.**, Savko M.A., Kaplin V.S., Aksenova N.A., Timofeeva V.A., Chernyak A.V., Glagolev N.N., Timashev P.S. and Solovieva A.B. Effect of Chitosan and Amphiphilic Polymers on the Photosensitizing and Spectral Properties of Rose Bengal // *Molecules* – 2022. – V. 20. – № 27. – 6796. <https://doi.org/10.3390/molecules27206796>.
6. Koifman O.I., Ageeva T.A., Kuzmina N.S., Otvagin V.F., Nyuchev A.V., Fedorov A.Yu., Belykh D.V., Lebedeva N.Sh., Yurina E.S., Syrbu S.A., Koifman M.O., Gubarev Y.A., Bunin D.A., Gorbunova Yu G., Martynov A.G., Tsivadze A.Yu., Dudkin S.V., Lyubimtsev A.V., Maiorova L.A., Kishalova M.V., Petrova M.V., Sheinin V.B., Tyurin V.S., Zamilatskov I.A., Zenkevich E.I., Morshnev P.K., Berezin D.B., Drondel E.A., Kustov A.V., Pogorilyy V.A., Noev A.N., Eshtukova-Shcheglova E.A., Plotnikova E.A., Plyutinskaya A.D., Morozova N.B., Pankratov A.A., Grin M.A., Abramova O.B., Kozlovtsseva E.A., Drozhzhina V.V., Filonenko E.V., Kaprin A.D., Ryabova A.V., Pominova D.V., Romanishkin I.D., Makarov V.I., Loschenov V.B., Zhdanova K.A., Ivantsova A.V., Bortnevskaya Yu S., Bragina N.A., Solovieva A.B., **Kuryanova A.S.**, Timashev P.S. Synthesis Strategy of Tetrapyrrolic Photosensitizers for Their Practical Application in Photodynamic Therapy // *Macroheterocycles*– 2022. – V. 15. – № 4. – P. 207–302. DOI: 10.6060/mhc224870k.
7. **Kuryanova A. S.**, Kardumyan V. V., Kaplin V. S., Aksenova N. A., Chernyak A. V., Timofeeva V. A., Glagolev N. N., Timashev P. S. and Solovieva A. B. Effect of amphiphilic polymers and sodium alginate on the activity of methylene blue in photogeneration of singlet oxygen $^1\text{O}_2$ // *Laser Physics* – 2023. – V. 33. – № 9. – 095601. DOI 10.1088/1555-6611/ace70e.