

ОТЗЫВ

официального оппонента Шухто Ольги Владимировны
на диссертацию Курьяновой Анастасии Сергеевны на тему:
«Активность бенгальского розового и метиленового синего в
присутствии амфифильных полимеров и полисахаридов в фотогенерации
синглетного $^1\text{O}_2$ кислорода», представленную на соискание ученой степени
кандидата химических наук по специальности 1.4.7 – Высокомолекулярные
соединения.

Одним из важнейших направлений медицинской химии инфекционных заболеваний является разработка малоинвазивных методов диагностики и лечения. К таким методам относится антимикробная фотодинамическая терапия, основанная на избирательном токсическом действии фотосенсибилизатора, накапливающегося в очаге заболевания, при облучении в присутствии кислорода. Преимуществами антимикробной фотодинамической терапии по сравнению с традиционными химиотерапевтическими методами являются селективность фотоинактивирующего действия фотосенсибилизатора на патогены и одновременное повреждение нескольких клеточных мишеней, а также низкая токсичность для окружающих здоровых тканей, отсутствие развивающейся резистентности к продолжению терапии.

В связи с вышеперечисленным **цель диссертационной работы** Курьяновой А.С., состоящую в создании эффективных фотосенсибилизирующих систем для АФДТ на основе антраценовых красителей, амфифильных полимеров и полисахаридов, со всей очевидностью следует считать высокоактуальной и соответствующей общемировым тенденциям развития химических и медицинских наук.

Автором диссертации проанализирован широкий ряд литературных источников, отражающих успехи АФДТ к настоящему времени. Особое внимание уделено механизмам фотодинамической терапии, подробно

классифицированы фотосенсибилизаторы, применяющиеся на данном этапе развития медицины, полимеры, полисахариды и фотосенсибилизирующие системы на их основе. Помимо ароматических тетрапиррольных макрогетероциклов, таких как порфирины, хлорины, фталоцианины и их аналоги, в фотодинамической терапии также широко используются немакроциклические соединения, в частности аминолевулиновая кислота, некоторые фенотиазиновые или цианиновые красители. Возможная широкая модификация этих соединений позволяет создать препараты, отвечающие современным требованиям. Большинство фотосенсибилизаторов, используемых в клинической практике, либо являются анионными, либо лишены заряженных групп. Большой интерес к фотосенсибилизаторам, несущим катионные группы, связан как с растворимостью таких соединений в воде, так и с их способностью проникать через клеточные мембраны антибиотикорезистентных грамотрицательных патогенов. Одним из существенных препятствий на пути широкого использования в клинической практике макроциклических фотосенсибилизаторов, включающих катионные формы, является агрегация этих соединений в водных растворах, что снижает не только эффективность генерации активных форм кислорода при облучении, а также сродство этих агентов к мембранам бактериальных клеток. Самый простой способ преодолеть агрегацию фотосенсибилизатора – создать виды лекарственных препаратов с использованием пассивных средств доставки, например, на основе биосовместимых ПАВ, липосом или полимеров. Автором работы получены фотосенсибилизирующие системы на основе антраценовых красителей (бенгальский розовый, метиленовый синий), некоторых амфифильных полимеров (ПВП, ПЭГ, плуроники) и полисахаридов. Методом ^1H -ЯМР спектроскопии показано наличие межмолекулярных взаимодействий в системе краситель – поливинилпирролидон, которые приводят к дезагрегации красителя в водных и буферных растворах, в связи с чем фотосенсибилизирующая активность увеличивается. Введение в системы полисахаридов с целью

комбинированного терапевтического воздействия на раневую поверхность уменьшает фотосенсибилизирующую активность красителей в генерации $^1\text{O}_2$, однако применение амфифильных полимеров в качестве солубилизаторов способно практически полностью восстановить исходную активность красителей. Наличие взаимодействия потенциальных фотосенсибилизаторов с амфифильными полимерами и полисахаридами в водной и фосфатно-буферной среде подтверждено изменением значений степени анизотропии флуоресценции двойных систем по сравнению с анизотропией растворов чистых красителей. Методом атомно-силовой микроскопии показано, что молекулы антраценовых красителей и макромолекулы ПАВ в растворе взаимодействуют друг с другом с изменением надмолекулярной структуры полимера.

Все вышесказанное определяет **новизну и практическую значимость** результатов, приведенных в диссертационной работе Курьяновой А.С.

Достоверность результатов, а также обоснованность научных положений и выводов, изложенных автором работы, подтверждается использованием в ней современных методов исследования, взаимной согласованностью полученных с их помощью экспериментальных данных и высоким научным уровнем обсуждения, а также публикацией основных результатов исследований в журналах, входящих в перечень ВАК и международные базы цитирования.

Работа Курьяновой А.С. построена традиционным образом, состоит из введения, обзора литературы (глава 1), методической части (Материалы и методы исследования, глава 2), обсуждения результатов, представленного в главах 3, 4 и 5 работы; включает основные результаты и выводы, приложение, список принятых обозначений и сокращений и список цитированной литературы (213 наименований). Работа представлена на 133 страницах текста, проиллюстрированных 43 рисунками и 11 таблицами.

Особо хочется отметить прикладной характер работы – эффективность некоторых из полученных фотосенсибилизирующих систем исследована при

лечении методом АФДТ полнослойной плоскостной раны у лабораторных животных.

В главе 1 (стр. 12 – 50) проведен тщательный анализ литературных источников, публикаций, касающихся сущности метода и порядка проведения антибактериальной фотодинамической терапии, его проблем и ограничений, механизмов генерации активных форм кислорода. Приведена подробная классификация фотосенсибилизаторов в соответствии с их типами, показаны химические структуры и дана характеристика соединений, использованных в работе (антраценовые красители, амфифильные полимеры, полисахариды), обсуждаются вопросы их состояния в растворах, представлены сведения об успешном применении метода АФДТ для инактивации как колоний патогенных бактерий, так и сформированных бактериальных биопленок. В заключение этой главы делается краткое резюме, формулируется проблема склонности потенциальных ФС к агрегации в водных растворах и необходимости применения солюбилизующих добавок совместно с использованием антисептических препаратов в качестве поддержки метода АФДТ.

В методической части работы (глава 2, стр. 51 – 58) автор представляет объекты исследования, их структуры, физические и химические характеристики, подробным образом приводит все методики, задействованные в исследовании – приготовление фотосенсибилизирующих систем, проведение реакций фотоокисления; расчетные формулы, методы проведения спектральных исследований, динамического рассеяния света и атомно-силовой микроскопии.

Главы 3, 4 и 5 представляют собой обсуждение полученных автором работы результатов, логически разделены на следующие части:

В главе 3 (с. 59 – 70) рассматривается влияние амфифильных полимеров на фотосенсибилизирующую активность бенгальского розового в реакции окисления триптофана. Исследована фотосенсибилизирующая активность бенгальского розового в воде и буферном растворе; на основании

ЭСП и спектроскопии флуоресценции сделан вывод о том, что агрегация препятствует фотокаталитической активности красителя. В ходе изучения зависимости эффективной константы скорости реакции фотоокисления триптофана в присутствии бенгальского розового в воде от концентрации амфифильного полимера (плюроники, ПЭГ, ПВП) показано, что в присутствии солубилизаторов фотокаталитическая активность ксантенового красителя изменяется нелинейно, что подтверждено и объясняется в работе в том числе на основании анализа ЭСП и спектров флуоресценции этих систем. Взаимодействие «бенгальский розовый – поливинилпирролидон» изучено методом ^1H - ^1H NOESY (спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера и обмена) и методом динамического светорассеяния.

В главе 4 (с. 73 – 81) автором работы представлены результаты исследования влияния амфифильных полимеров на фотосенсибилизирующую активность метиленового синего в реакции фотоокисления триптофана. Как и в предыдущей главе, изучена фотокаталитическая активность метиленового синего в воде, проведен анализ ЭСП и спектров флуоресценции водных растворов тиазинового красителя в отсутствие и в присутствии солубилизаторов, фотокаталитическая активность систем «метиленовый синий – амфифильный полимер», представлены данные ^1H -ЯМР спектроскопии метиленового синего, ПВП и системы «метиленовый синий – ПВП», а также результаты изучения систем «метиленовый синий – амфифильный полимер» методом ДРС.

В главе 5 (с. 82 – 100) изучено влияние полисахаридов на фотокаталитическую активность комплексов антраценовых красителей с амфифильными полимерами: фотокаталитическая активность систем «бенгальский розовый – хитозан» в буферном растворе, «метиленовый синий – альгинат натрия» в воде, показано снижение $k_{\text{эфф}}$ в присутствии полисахарида и практически полное восстановление фотокаталитической активности в присутствии солубилизатора – амфифильного полимера, сделано предположение о природе взаимодействия бенгальского розового с

хитозаном в растворе. Представлены результаты спектрофотометрического исследования систем «бенгальский розовый – хитозан» и «бенгальский розовый – хитозан – амфифильный полимер» в буферном растворе; «метиленовый синий – альгинат натрия» и «метиленовый синий – альгинат натрия – амфифильный полимер» в воде. Изучено влияние указанных полимеров на степень анизотропии флуоресценции антраценовых красителей. Структура поверхностей образцов пленок антраценовых красителей в присутствии амфифильных полимеров и полисахаридов изучена методом атомно-силовой микроскопии.

Основные результаты и выводы представлены на стр. 101 – 102.

На стр. 103 – 106 (Приложение) приведены методика и результаты микробиологического эксперимента по определению эффективности некоторых из изученных в работе фотосенсибилизирующих систем при лечении модельной полнослойной плоской кожной раны у лабораторных животных методом ФДТ.

Одним из наиболее существенных научных результатов, полученных в диссертационной работе Курьяновой А.С. является, по нашему мнению, определение и получение исчерпывающих доказательств дезагрегации систем «краситель-полисахарид» в присутствии неионогенных ПАВ в водных растворах, что существенно упрощает реализацию метода АФДТ в совмещении с традиционной антибактериальной терапией.

Диссертационная работа написана грамотным научным языком, легко читается, в ней имеется очень незначительное количество неудачных выражений или опечаток (стр. 6 – репликация ДНК, транскрипция и трансляция белков – не мишени, а процессы, в отличие от клеточной стенки и цитоплазматической мембраны; стр. 8 – все сокращения и аббревиатуры в работе сделаны кириллицей, кроме PBS; стр. 8 и далее – вместо «разагрегирование» следует использовать устоявшийся общепринятый термин «дезагрегирование» или «дезагрегация»; стр. 11 – название конференции с маленькой буквы, город Иваново; стр. 16 – лучше «в

интервале длин волн»; стр. 16 – «зависит от множества факторов, в том числе природы ФС и внутриклеточной локализации фотоактивного соединения»; стр. 18 – аминокислота; стр. 19 – ошибка в изображении структурной формулы фотодитазина; стр. 20 – гиперин; стр. 23 – полоса «смещена», а не «сдвинута»; стр. 23 и далее – полосы в ЭСП нельзя называть « $\lambda_{плечо}$ », есть принятая в спектроскопии терминология (Q_I , Q_{II} и т.д.); стр. 24 и далее – в ЭСП ось ординат называют A (absorption), а не D (density); стр. 30 – не существует «протона водорода»; стр. 31 катионной; стр. 33 и далее – слово «агломерат» не синоним «агрегат» или «ассоциат», частицы в агломератах обычно связаны между собой более сильными взаимодействиями, чем в агрегатах; стр. 40 – неиммуногенный; стр. 45 – альгината натрия, псевдомонады; стр.46 – так же как; стр. 55 – спектры регистрировали; стр. 60 – асимметричная; стр. 63 – фотокаталитическая; стр. 86 – выше, чем).

Вместе с тем, в связи со сложностью (мультидисциплинарностью) решаемых в работе научных проблем, при её прочтении возникают некоторые вопросы и замечания:

1. На рисунке 6 (стр. 22) ксантеновые красители изображены в разных формах, существующих при различных значениях pH: флуоресцеин в молекулярной, неионизированной по карбокси- и гидроксигруппам, т.е. предположительно в слабокислой среде, где он тогда преимущественно должен находиться в лактонной форме, остальные – в виде натриевых солей, которые образуются лишь в водно-основных средах. Для понимания структуры желательно представлять молекулы, строение которых зависит от кислотности среды, при сходных значениях pH.

2. Показанные на рисунке 8 (стр. 25) формы бенгальского розового не могут соответствовать действительному строению красителя в этих средах. У формы, изображенной при pH = 0, т.е. в сильнокислой среде, имеется свободная карбокси-группа (в виде соли), при pH = 2,6 – 3,0 (всё ещё сильнокислая среда) образуется лактонный цикл, который при переходе в нейтральную и щелочные среды снова разрушается. В сильнокислых средах

не может быть групп $-\text{COONa}$ и $-\text{ONa}$, они находятся преимущественно в виде недиссоциированных $-\text{COOH}$ и $-\text{OH}$. С какими из таутомерных форм бенгальского розового проводились исследования, представленные в главе 3 (на рисунке 20 изображена структура, существующая в растворах только при рН выше 7)? Влияет ли наличие либо отсутствие лактонного цикла на спектральные свойства красителя и его способность к катализу реакции фотоокисления в рамках тех значений рН, при которых проводились исследования?

3. Зависимости эффективной константы скорости реакции фотоокисления триптофана от концентрации бенгальского розового в воде и фосфатно-солевом буфере определены в интервале отношений концентраций триптофан : бенгальский розовый = (3,3/1 – 40/1), фотокаталитическая активность красителя в присутствии полимеров при этом определялась для отношений концентраций триптофан : бенгальский розовый = 50, 20 и 10, примерно те же избытки были в присутствии полисахаридов. Какова необходимость увеличивать содержание триптофана в реакции фотоокисления в присутствии красителя при введении в систему полисахарида и солилизатора? Можно ли потом сравнивать результаты таких реакций?

Почему для аналогичного исследования триптофан берется в соотношении к метиленовому синему в избытке лишь 1,5/1 – 6/1 (рисунок 31), фотокаталитическая активность красителя в присутствии полимеров при этом определялась для отношений концентраций триптофан : метиленовый синий = 6/1 (рисунок 33)?

4. Существуют ли литературные данные о растворителях, в которых бенгальский розовый и метиленовый синий находятся строго в мономолекулярной неагрегированной форме? Количественное сравнение ЭСП красителя в таком растворителе со спектрами, представленными на рисунке 27, могло бы дать больше информации о природе взаимодействия

бенгальского розового с ПВП, а именно, возможно, объяснить большой батохромный сдвиг I полосы поглощения в сравнении с другими ПАВ.

5. Схема на странице 84 указывает на взаимодействие ионизированной карбокси-группы с одной стороны и фенолят-иона с другой стороны молекулы бенгальского розового с $-\text{NH}_3^+$ -группами хитозана, однако при $\text{pH} = 4,5$ (в среде уксусной кислоты, в которой изучалось это взаимодействие) сомнительно наличие карбоксилат – иона, и тем более фенолятов, если только не сама аминогруппа хитозана вызывает депротонирование $-\text{COOH}$ и $-\text{OH}$, что в кислой среде маловероятно.

6. Представленные на рисунке 41 диссертации данные спектрофотометрического и флуоресцентного титрования следовало бы расширить в область больших концентраций полимеров, т.к. выход на плато однозначно не достигнут, как и не обнаружена возможная экстремальная зависимость.

7. По какой причине для исследования структуры поверхностей образцов антраценовых красителей в присутствии полимеров и полисахаридов методом атомно-силовой микроскопии был выбран Pluronic F108, тогда как в остальных проведенных исследованиях ПВП показал себя наилучшим дезагрегирующим агентом?

8. Методику определения эффективности фотосенсибилизирующих систем «краситель – амфифильный полимер» при модельной полнослойной плоской кожной раны у лабораторных животных методом ФДТ следовало бы привести в методической части работы, а не в приложении, а результаты микробиологического эксперимента и их обсуждение – в основной части работы, т.к. эти данные являются подтверждением выполнения целей всего исследования.

Высказанные замечания ни в коей мере не снижают позитивного впечатления от выполненной автором диссертационной работы, являющейся завершённым научным исследованием.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Результаты, полученные в работе, опубликованы в виде 7 статей в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, положения диссертационной работы обсуждались на конференциях всероссийского и международного уровня и были опубликованы в качестве тезисов 11 докладов.

Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства Российской Федерации от № 842 24 сентября 2013 г., предъявляемым ВАК России к кандидатским диссертациям, а её автор, Курьянова Анастасия Сергеевна заслуживает присвоения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.7 – Высокомолекулярные соединения.

Официальный оппонент

ФИО оппонента:



Шухто Ольга Владимировна

Почтовый адрес:

153000, г. Иваново,
Шереметевский пр-т, 7.

Телефон:

+7 (4932) 30-73-46

Адрес электронной почты:

shukhto@isuct.ru

Наименование организации:

Федеральное государственное
бюджетное образовательное
учреждение высшего
образования «Ивановский
государственный химико-
технологический университет»
Кандидат химических наук
(1.4.1 – Неорганическая химия),
доцент кафедры органической
химии

Должность:

22.01.2024

Подпись Шухто О.В. подтверждаю.

Ученый секретарь ФГБОУ ВО «ИГХТУ», к.э.н.



Хомякова Анна Александровна