

«УТВЕРЖДАЮ»
Первый проректор
Федерального государственного бюджетного
учреждения высшего образования
«МИРЭА – Российский технологический университет»



Прокопов Н.И.

2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет»
на диссертационную работу **Курьяновой Анастасии Сергеевны**
«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 научной специальности **1.4.7. Высокомолекулярные соединения**

Поиск эффективных фотосенсибилизаторов для антимикробной фотодинамической терапии (АФДТ), которая в последнее время становится полноценной альтернативой антибиотикотерапии при лечении локальных инфекционных процессов мягких тканей (трудно заживающие раны, трофические язвы, диабетические стопы), не теряет своей актуальности, поскольку необходимость использования новых подходов к лечению подобных инфекционных процессов – реальность уже сегодняшнего дня. Лечение гнойных ран занимает особое место среди многочисленных проблем хирургии. За последние несколько десятков лет в решении этого вопроса достигнуты немалые успехи. Появились разнообразные средства, а также развиваются методы, которые позволяют ускорять регенеративные процессы в ранах и предотвращать их вторичное инфицирование, но, несмотря на достигнутые успехи, множество конкретных вопросов еще далеки от своего разрешения.

В основе антимикробной ФДТ лежит окислительная деструкция патогенных микроорганизмов при воздействии синглетного $^1\text{O}_2$ кислорода как активного окисляющего агента, который генерируется при световом, в том числе, лазерном

облучении предварительно обработанных фотосенсибилизатором (ФС) пораженных областей тканей. Считается, что АФДТ оказывает выраженное антибактериальное воздействие на течение раневого процесса и стимулирует местные регенеративные процессы в ранах. Это проявляется в сокращении сроков очищения раны от гнойно-некротических масс и ускоренном росте грануляционной ткани. Важно при этом, что эффективность АФДТ не зависит от спектра чувствительности патогенных микроорганизмов к антибиотикам, в частности, она оказалась губительной даже для антибиотикорезистентных штаммов синегнойной палочки, золотистого стафилококка, кишечной палочки и др. Кроме того, противомикробное действие АФДТ не убывает со временем при длительном применении в лечении хронических инфекционных процессов. У патогенных микроорганизмов не развивается устойчивость к АФДТ. Однако для широкого использования АФДТ необходимо повышать эффективность используемых фотосенсибилизирующих препаратов, снижать их дозы, повышать доступность метода.

Диссертационная работа Курьяновой А.С. посвящена *актуальному аспекту* этой общей проблемы – исследованию и установлению возможного механизма взаимодействия компонентов фотосенсибилизирующей системы на основе красителей и амфифильных полимеров (АП).

Диссертация представляет собой систематическое исследование влияния структуры и физико-химических свойств амфифильных полимеров на фотоактивность антраценовых красителей (АК) – бенгальского розового и метиленового синего в генерации синглетного кислорода, которую определяли в модельной реакции фотоокисления триптофана. Фотоактивность композиций краситель - амфифильный полимер была также установлена и в экспериментах *in vivo* – при лечении экспериментальных ран у крыс методом АФДТ. Кроме того, в работе впервые были получены фотосенсибилизирующие композиции на основе красителей, амфифильных полимеров и биологически активных полисахаридов (ПС) с собственной бактерицидностью, также обладающих высокой активностью в генерации синглетного кислорода.

Следует отметить, что в настоящее время в практике ФДТ используются в основном активные, но довольно сложно получаемые и достаточно дорогие фотосенсибилизаторы тетрапиррольного ряда (порфирины, хлорины, бактериохлорины). Поэтому выполненное Курьяновой А.С. исследование фотосенсибилизирующих свойств более доступных антраценовых красителей как достаточно эффективных фотосенсибилизаторов генерации синглетного кислорода и создание ФС-систем на их основе, безусловно, представляет не только научный, но и практический интерес. Иначе говоря, *научная новизна и практическая значимость диссертации Курьяновой А.С. не*

вызывают сомнений.

Диссертация Курьяновой А.С. построена классическим образом и состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), экспериментальной части (Глава 2), изложения полученных результатов и их обсуждения (Главы 3, 4, 5), приложения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 133 страницах машинописного текста, содержит 43 рисунка, 11 таблиц. Список цитируемых источников состоит из 213 наименований.

Во **Введении** автор диссертации дает обоснование актуальности проводимых исследований, формулирует их цель и основные задачи.

В **Обзоре литературы** (глава 1) изложены существующие представления о механизме фотодинамической терапии, о структуре и физико-химических свойствах исследуемых красителей; дана информация о структуре и свойствах амфифильных полимеров, в том числе, плороников, поливинилпирролидона и полиэтиленгликоля; представлены данные о структуре и свойствах полисахаридов. Обзор достаточно полный и написан хорошим языком. Он дает представление о современном состоянии науки в области, связанной с темой диссертационной работы.

В разделе **Материалы и методы исследования** (глава 2) содержится описание объектов исследования и подробно излагаются экспериментальные методы, использованные в работе. Основное внимание в работе уделено исследованию кинетики фотоокисления и определению эффективной константы $k_{эфф}$ скорости фотоокисления триптофана в присутствии разных ФС-конструкций, в том числе, в присутствии амфифильных полимеров и полисахаридов. Следует указать, что реакция фотоокисления триптофана широко используется как модельная для установления активности ФС разной структуры в фотогенерации синглетного кислорода. Эксперименты проводились в водной среде и в буферном растворе (PBS, pH-7,4). При широком использовании в работе спектральных методов исследования фотофизических и фотохимических характеристик красителей на основе установленных кинетических закономерностей была получена прямая и всесторонняя информация о природе взаимодействий АК с амфифильными полимерами и полисахаридами, влияющих на фотосенсибилизирующие свойства используемых красителей.

В **главах 3 и 4** Курьяновой А.С. описаны результаты исследования спектральных свойств и фотокаталитической активности антраценовых красителей – анионного (бенгальского розового, БР) и катионного (метиленового синего, МС) в реакции фотоокисления триптофана. Для указанных красителей получены, в частности, зависимости величины эффективной константы $k_{эфф}$ скорости реакции от концентрации

красителя и концентраций в реакционной системе амфифильных полимеров. Показано, в частности, что с увеличением концентрации красителей величина $k_{эфф}$ снижается, что связано, несомненно, с ростом содержания агрегированных форм БР и МС при увеличении их концентрации в растворе. Здесь следует указать, что найденные значения $k_{эфф}$ для БР в водной среде и в буферном растворе (более близком к внутриклеточной среде) практически совпадают. Однако значения $k_{эфф}$ для МС были получены только в водной среде, поскольку этот краситель в буферном растворе практически нерастворим.

Курьяновой А.С. показано, что агрегация молекул красителей, происходящая при увеличении концентрации БР и МС в водном растворе (и для БР – в буферном растворе), влияет на их ЭСП и спектры флуоресценции. Известно, что спектр поглощения антраценовых красителей состоит из двух полос – основной, с максимумом при $\lambda = 550$ нм (БР) или 665 нм (МС), относящейся к мономерной форме АК, и «плеча» в области $\lambda = 515$ нм (БР) или 610 нм (МС), связанного с димерной формой красителя. Интересно отметить, что с ростом концентрации красителей наблюдается рост оптической плотности обеих полос. Иными словами, при увеличении концентрации АК (в диапазоне $10^{-6} - 10^{-5}$ М) происходит рост как димерных, так и мономерных форм красителя. Однако при этом равновесие (мономерная форма АК \leftrightarrow димерная форма АК) сдвигается в сторону образования димеров. Снижение интенсивности флуоресценции (за счет концентрационного тушения) происходит уже при концентрации красителей $\sim 5 \times 10^{-6}$ М. Как следует из представленных данных, метод флуоресцентной спектроскопии в данном случае оказался более информативным, чем оптическая спектроскопия. Поэтому Курьянова А.С. достаточно обоснованно проводила основные кинетические исследования при меньших концентрациях АК, равных 2×10^{-6} М, когда возможная агрегация молекул АК, подавляющая активность АК в реакции фотоокисления триптофана (т.е., в фотогенерации синглетного кислорода), минимальна, так что установленные кинетические закономерности вполне достоверны.

Наиболее важный результат, приведенный Курьяновой А.С. в главе 3, это выявление взаимодействия между макромолекулами амфифильных полимеров и структурными фрагментами молекул антраценовых красителей, что было также подтверждено методами электронной и флуоресцентной спектроскопии и методом ^1H ЯМР. При этом взаимодействие БР с ПВП оказалось более выраженным, чем в случае системы МС – ПВП, поскольку в последнем случае это удалось выявить только с использованием двумерной спектроскопии ЯМР, включающей обменную ядерную спектроскопию (EXSY) и ядерную спектроскопию с эффектом Оверхаузера (NOESY). Взаимодействие в системах АК-АП объясняет эффект повышения $k_{эфф}$ фотоокисления

триптофана, катализируемого АК в присутствии АП.

В диссертации приведены также данные о влиянии АП (плюроники F108 и F127, ПЭГ, ПВП) на спектры поглощения и флуоресценции бенгальского розового и метиленового синего. При этом оказалось, что «ряд активности» амфифильных полимеров по влиянию на величину эффективной константы скорости и на положение полос поглощения и флуоресценции не совпадают. В частности, при введении в систему ПВП, когда проявлялись наиболее слабые воздействия на величину $k_{эфф}$, наблюдался наибольший рост интенсивности флуоресценции и сдвиг полос поглощения красителей. Все это указывает на то, что описанные в диссертации эффекты влияния АП на ФС-активность формируемых АК-АП систем обусловлены более тонкими эффектами, нежели изменения в химической структуре, проявляющиеся в оптической области спектра. На это указывает и отмеченная выше информативность исследуемых в этих системах спектрах ПМР. Курьянова А.С. в данном случае пишет о «неэффективном связывании АК с молекулами ПВП», когда ФС и субстрат оказываются разъединенными, в результате чего скорость фотоокисления не растёт или растёт незначительно в присутствии ПВП. Однако дополнительные эксперименты для выяснения механизма данных закономерностей в работе проведены не были.

Для повышения эффективности антимикробной фотодинамической терапии иногда одновременно с АФДТ применяют биологически активные вещества, обладающие ранозаживляющим и противовоспалительным действием – протеолитические ферменты, антиоксиданты, полисахариды, факторы роста. Данный подход также был использован диссертантом, и результаты проведенного исследования по влиянию полисахаридов (ПС) на фотокаталитическую активность комплексов антраценовых красителей с амфифильными полимерами представлены в главе 5. Конкретно, была исследована возможность использования ПС, обладающих противомикробными и ранозаживляющими свойствами – хитозана как поликатиона (в системах с БР как анионом) и альгината натрия как полианиона (в системах с МС как катионом). Для этого, прежде всего, необходимо было понять, как ионные взаимодействия ПС с АК могут влиять на фотосенсибилизирующие свойства антраценовых красителей.

Курьяновой А.С. было показано, что введение противоположно заряженного полиэлектролита в систему с ионным красителем, понижает величину эффективной константы $k_{эфф}$ скорости фотоокисления триптофана в несколько раз. Однако введение амфифильных полимеров в систему АК – ПС восстанавливают ФС-активность красителей до значений, близких или практически (при введении ПВП) равных исходным. Наиболее эффективен в обоих случаях оказывался ПВП. Иначе говоря, в тройной системе АК-ПС-

ПВП вводимый ПВП «защищал» БР и МС от ионных взаимодействий с полисахаридами, но, так же, как и в двойных системах АК-АП, практически не повышал активности красителей. Возможно, «блокировка» взаимодействия красителей с полисахаридами при введении ПВП происходила за счет образования межмолекулярных связей ПС – ПВП. Действительно, в структуре поливинилпирролидона присутствуют донорно-акцепторные группировки, способные связываться с фрагментами полисахаридных макромолекул и блокировать взаимодействия АК-ПС. Это открывает возможности использования тройных систем АК-ПС-ПВП в качестве активной ФС системы в АФДТ вследствие проявления противомикробных и ранозаживляющих свойств ПС.

Интересные результаты, подтверждающие способность антраценовых красителей участвовать в гидрофобных и ионных взаимодействиях с полимерами, изменяя фотосенсибилизирующую активность АК, были получены Курьяновой А.С. при исследовании влияния АП и ПС на спектральные характеристики красителей. Оказалось, что в присутствии хитозана и альгината натрия происходит существенное уменьшение оптической плотности полос поглощения и интенсивности флуоресценции БР и МС, соответственно. Но при этом положение полос поглощения и флуоресценции в спектрах остается неизменным. В то же время, присутствие амфифильных полимеров в растворах, содержащих БР и хитозан, вызывает заметный (~10-20нм) батохромный сдвиг полос поглощения и флуоресценции. В случае МС смещения полос в спектрах поглощения и флуоресценции в присутствии амфифильных полимеров не наблюдалось, как полагает Курьянова А.С., из-за более слабых взаимодействий в системе МС – АП по сравнению с системой БР - АП. О справедливости такого утверждения, т.е., о достаточно сильном взаимодействии БР с амфифильными полимерами, свидетельствует заметный рост анизотропии r флуоресценции БР в присутствии поливинилпирролидона. Но наиболее сильное изменение величины r наблюдалось для систем АК – ПС, что выглядит вполне закономерно для ионных красителей в присутствии полиэлектролитов.

Хочется отметить, что диссертационная работа Курьяновой А.С. является первым исследованием особенностей проявления антраценовыми красителями как наиболее доступными и эффективными ФС, имеющими собственные антибактериальные свойства, активности в генерации синглетного кислорода в присутствии амфифильных полимеров и биологически активных полисахаридов. При этом полученные в модельных условиях результаты по влиянию амфифильных полимеров на активность АК в фотоокислении триптофана подтверждены экспериментами *in vivo*: при лечении модельных ран у крыс методом АФДТ система АК-АП оказалась эффективнее исходных антраценовых красителей. Следует отметить, что в литературе имеется несколько работ, где

фотосенсибилизирующую активность антраценовых красителей в условиях освещения изучали на клеточных культурах, в том числе, в присутствии ПС и F108. Однако, как следует из диссертационной работы Курьяновой А.С., ПС практически блокируют фотодинамическую активность АК, так что при использовании антраценовых красителей в АФДТ необходимо совместно с полисахаридами вводить в систему амфифильные полимеры.

В разделе *Основные результаты и выводы* обобщены наиболее значимые результаты и выводы диссертации и представлены перспективы дальнейшей разработки темы.

Результаты диссертационной работы Курьяновой А.С. изложены в 7 статьях в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, а также в тезисах 11 докладов.

По работе имеются некоторые вопросы и замечания:

1. В чем заключаются преимущества используемых фотоактивных красителей по сравнению с известными фотодинамическими агентами тетрапиррольного ряда?
2. Какова глубина проникновения в ткани у антраценовых красителей?
3. Что представляют собой полимерные композиции? Это смеси или сформированные наночастицы? Оценивали ли стабильность полученных систем во времени?
4. В работе высказано предположение, что отсутствие у ПВП способности повышать фотокаталитическую активность красителя при взаимодействии с БР вызвано так называемым «неэффективным связыванием», однако никаких дополнительных экспериментов, например, определения гидрофобно-липофильного баланса (ГЛБ) используемых АП для подтверждения этой гипотезы проведено не было. А это помогло бы понять, полимеры с какой структурой могли бы повышать активность конкретных антраценовых красителей.
5. В работе для оценки активности АК в генерации синглетного кислорода использовалась только реакция фотоокисления триптофана. Поскольку работа по определению фотосенсибилизирующей активности антраценовых красителей в присутствии ПС и АП в фотогенерации синглетного кислорода проведена впервые, хорошо было бы провести эксперименты по непосредственному определению генерации $^1\text{O}_2$ по его люминесценции. Это сняло бы вопросы по возможному повышению скорости процесса в присутствии АП за счет мицеллярного катализа.

6. Проводились ли биологические испытания антибактериальных свойств полимерных систем в условиях *in vitro*?
7. В работе при получении полимерных фотосенсибилизирующих систем краситель впрыскивали в раствор полимера. Почему был выбран данный подход, а не метод тонкой пленки – одновременное растворение компонентов и удаление растворителя с целью получения наночастиц?
8. На стр. 72 размер образующихся частиц объясняется фразой: «В присутствии АП (плюроник F108, ПВП) при той же концентрации красителя размер частиц БР уменьшается в 1,2 – 1,5 раза, что подтверждает факт частичной дезагрегации молекул бенгальского розового в присутствии амфифильных полимеров». Однако, ряд литературных данных, посвященных данной тематике, указывает на обратное поведение красителей: размер образующихся наночастиц становится больше (<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010273>, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2017.09.045>). Как можно объяснить полученные результаты?

Высказанные замечания не влияют на общую высокую оценку рецензируемой работы, поскольку достоверность и принципиальная новизна результатов диссертации Курьяновой А.С. сомнений не вызывает. Автореферат и опубликованные Курьяновой А.С. научные работы достаточно полно отражают содержание диссертации.

Таким образом, считаем, что диссертация Курьяновой А.С. является научно-квалификационной работой, в которой впервые проведено систематическое исследование спектральных характеристик и фотокаталитической активности полимерных фотосенсибилизирующих (ФС) систем в водосодержащих средах на основе доступных базовых антраценовых красителей – бенгальского розового и метиленового синего с полимерами разного класса – амфифильными полимерами и полисахаридами в модельной реакции окисления триптофана, позволившее установить эффекты влияния на константу скорости ФС процесса молярных концентраций вводимых полимеров. Полученные результаты имеют существенное значение для понимания механизма фотоактивируемых процессов инактивации патогенных микроорганизмов.

Результаты данного диссертационного исследования представляют интерес для научных организаций и учреждений, занимающихся проблемами в области химии и практического использования высокомолекулярных соединений, и могут быть использованы в работе федеральных государственных автономных образовательных учреждений высшего образования: «Московский государственный университет им. М.В.

Ломоносова», «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», «Санкт-Петербургский государственный университет», «Казанский (Приволжский) федеральный университет», «Ивановский государственный химико-технологический университет», «Северо-Кавказский федеральный университет», «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»; федеральных государственных бюджетных учреждений науки: Институт органической химии им. Зелинского РАН, Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского НЦ РАН, Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН и других учебных и научных учреждениях соответствующего профиля.

Работа *соответствует паспорту специальности 1.4.7. Высокмолекулярные соединения* по направлениям исследований:

- 1) **п. 3** «Основные признаки и физические свойства линейных, разветвленных, в том числе сверхразветвленных, и сетчатых полимеров, их конфигурация (на уровнях: звена, цепи, присоединения звеньев, присоединения блоков) и конформация. Учет влияния факторов, определяющих конформационные переходы. Роль межфазных границ. Надмолекулярная структура и структурная модификация полимеров.
- 2) **п. 9** «Целенаправленная разработка полимерных материалов с новыми функциями и интеллектуальных структур с их применением, обладающих характеристиками, определяющими области их использования в заинтересованных отраслях науки и техники».

На основании вышеизложенного можно заключить, что диссертационная работа Курьяновой А.С. *полностью отвечает требованиям п. 9 «Положение о присуждении ученых степеней»*, утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, и «Изменений, которые вносятся в Положение о присуждении ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 336. Автор диссертационной работы, *Курьянова Анастасия Сергеевна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по научной специальности 1.4.7. Высокмолекулярные соединения.*

Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании кафедры химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Н.А. Преображенского (протокол № 5 от 28 декабря 2023 года).

Отзыв составил:

Профессор кафедры химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Н.А. Преображенского, доктор химических наук



/Брагина Н.А./

Заведующий кафедрой химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Н.А. Преображенского, доктор химических наук


/Грин М.А./

Подлинность подписей Брагиной Н.А. и Грина М.А. удостоверяю:




11.01.24

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«МИРЭА - Российский технологический университет» (ПТУ МИРЭА)
119454, Москва, проспект Вернадского, 78
Тел.: +7 (499) 600 80 80
e-mail: rector@mirea.ru