

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ  
ИМ. Н.Н. СЕМЕНОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*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**

1.4.7 – высокомолекулярные соединения

диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор

Соловьева Анна Борисовна

Москва 2023

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	12
1.1. Антибактериальная фотодинамическая терапия.....	12
1.1.1. Механизмы АФДТ .....	14
1.1.2. Фотосенсибилизаторы .....	16
1.2. Бенгальский розовый и его физико-химические свойства.....	21
1.2.1. Спектральные свойства бенгальского розового.....	23
1.3. Физико-химические свойства метиленового синего.....	26
1.3.1. Спектральные свойства метиленового синего .....	28
1.4. Самоорганизация антраценовых красителей.....	31
1.5. Амфифильные полимеры.....	34
1.5.1. Плуроники.....	34
1.1.1. Поли-N-винилпирролидон .....	37
1.5.3. Полиэтиленгликоль.....	40
1.6. Полисахариды и их антибактериальные свойства .....	41
1.5.3. Хитозан .....	42
1.6.2. Альгинат натрия .....	44
1.7. Фотодинамическая инактивация патогенной микрофлоры с использованием антраценовых красителей в качестве фотосенсибилизаторов в присутствии АП и полисахаридов .....	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	51
2.1. Объекты исследования.....	51
2.2. Получение фотосенсибилизирующих систем на основе АК-АП, АК-ПС и АК-АП-ПС .....	52
2.2.1. Исследование фотосенсибилизирующих свойств полученных систем в генерации $^1O_2$ в водных и PBS растворах .....	53

2.3. Методы исследования природы взаимодействий в системах АК-полимер ..	55
2.3.1. Спектральные методы исследования.....	55
2.3.2. Динамическое рассеяние света.....	57
2.3.3. Атомно-силовая микроскопия.....	58

### ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ АМФИФИЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ НА ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ БЕНГАЛЬСКОГО РОЗОВОГО В РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ТРИПТОФАНА..... 59

3.1. Фотосенсибилизирующая активность БР в воде и PBS.....	59
3.1.1. Электронные спектры поглощения и спектры флуоресценции БР в воде и PBS .....	60
3.2. Особенности фотокаталитической активности систем БР-АП.....	62
3.2.1. Влияние АП на ЭСП и спектры флуоресценции БР в воде.....	65
3.2.2. Соотношение мономерных – димерных форм БР в отсутствие и в присутствии АП .....	67
3.3. Исследование системы БР-ПВП методом $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY (спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера и обмена).....	70
3.4. Определение размера частиц БР, АП и систем БР-АП в воде методом ДРС	71

### ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ АМФИФИЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ НА ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В РЕАКЦИИ ФОТООКИСЛЕНИЯ ТРИПТОФАНА ..... 73

4.1. Фотокаталитическая активность метиленового синего в воде .....	73
4.1.1. Спектральные свойства МС.....	74
4.2. Особенности фотокаталитической активности систем МС-АП.....	76
4.2.1. Влияние АП на ЭСП и спектры флуоресценции МС .....	78
4.3. $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопия МС, ПВП и системы МС-ПВП.....	79
4.4. Размер частиц МС, АП и систем МС-АП в водной фазе по данным метода ДРС .....	81

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ НА ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ АНТРАЦЕНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С АМФИФИЛЬНЫМИ ПОЛИМЕРАМИ .....	82
5.1. Влияние полисахаридов на фотокаталитическую активность АК .....	82
5.1.1. Фотокаталитическая активность системы БР-ХТЗ в PBS.....	82
5.1.2. Влияние АН на фотокаталитическую активность МС в водном растворе..	85
5.2. Фотосенсибилизирующая активность систем АК-АП-ПС.....	86
5.3. Влияние АП на спектры поглощения и флуоресценции АК-ПС.....	88
5.3.1. ЭСП и спектры флуоресценции БР-ХТЗ и БР-АП-ХТЗ в PBS.....	88
5.3.2. Спектральные свойства систем МС-АН и МС-АП-АН в воде.....	91
5.4. Влияние полимеров на степень анизотропии флуоресценции АК.....	94
5.5. Исследование структуры поверхностей образцов АК, АК-АП, АК-ПС и АК-АП-ПС методом АСМ.....	96
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ .....	101
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	103
1) Создание модельной раны у лабораторных животных .....	103
2) Порядок проведения ФДТ.....	103
3) Гистологический анализ .....	105
4) Заключение .....	105
СПИСОК ПРИНЯТЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	108

## ВВЕДЕНИЕ

Растущая антибиотикорезистентность патогенных микроорганизмов, положившая конец «эре антибиотиков», длившейся последние 50 лет, привела исследователей всего мира 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 бактериальных и грибковых заражений, опосредованная активными формами кислорода (АФК) [2, 3]. Метод АФДТ основан на уничтожении патогенных микроорганизмов при воздействии на них АФК, прежде всего синглетного кислорода  $^1O_2$ , образующегося при передаче энергии молекулярному кислороду возбужденными молекулами фотосенсибилизатора (ФС), предварительно введенного в пораженную область ткани. 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 ( $^1ФС \rightarrow ^1ФС^* \rightarrow ^3ФС^*$ ), после чего становится возможным процесс переноса энергии возбуждения на молекулы кислорода в триплетном состоянии с образованием синглетного кислорода. Кроме того, в 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, а АФДТ – перспективный способ борьбы с возбудителями заболеваний, устойчивыми к действию традиционных препаратов [4].

Поскольку необходимый для возбуждения молекул ФС процесс освещения является локализованным, 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 кровотоки и накапливается в опухоли, АФДТ при локализованных инфекциях осуществляется путем локальной доставки ФС в зараженную зону путем инъекций, нанесения геля или аэрозоля, смачивания.

В клинической практике при лечении методом АФДТ гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей преимущественно применяют ФС порфириновой природы – фотосенс, фотодитазин, радахлорин, аласенс [5]. 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, помимо фотосенсибилизирующих, собственными антибактериальными свойствами [6]. В частности, для БР и МС характерен высокий квантовый выход  $\Phi_{\Delta}$  генерации синглетного  $^1O_2$  кислорода ( $\Phi_{\Delta \text{ БР}} \sim 0,8$  и  $\Phi_{\Delta \text{ МС}} \sim 0,5$  соответственно) [7, 8]. При этом 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 отмечено, 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 [9 – 11]. Активность ФС в фотогенерации  $^1O_2$  определяли по скорости фотоокисления триптофана, тестовой реакции для установления активности фотосенсибилизаторов разных классов [9].

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) [12, 13].

**Целью настоящей работы является создание эффективных фотосенсибилизирующих систем для АФДТ на основе антраценовых красителей, амфифильных полимеров и полисахаридов и 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 фенотиазиновой природы – метиленовый синий, которые применяются в медицинской практике уже более века и проходят доклинические и клинические исследования в разных странах мира в качестве фотосенсибилизирующих препаратов для АФДТ.

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 полисахаридов ХТЗ и АН, обладающих противомикробными и ранозаживляющими свойствами в разрабатываемых АК-АП системах, позволяет повысить эффективность данных систем при лечении инфицированных ран методом АФДТ.

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

определить:

а) фотосенсибилизирующую активность красителей БР и МС в реакции фотоокисления триптофана в зависимости от их концентрации в водном и буферном (PBS) растворах;

б) 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;

в) 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 АК (БР, МС)-АП (ПВП, плуроник F108), обладающие высокой фотосенсибилизирующей активностью в генерации синглетного  $^1O_2$  кислорода. Данные системы оказались также более эффективны 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 агрегированию ассоциатов АК, что определяет рост удельной фотосенсибилизирующей активности ФС.

Показано, что электростатические взаимодействия в системе АК-ПС 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.

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.

Наличие взаимодействия АК-ПС и АК-АП в водной и фосфатно-буферной среде (PBS) было подтверждено изменением значений степени анизотропии флуоресценции ( $r$ ) указанных двойных систем по сравнению с анизотропией растворов чистых красителей. Показано, в частности, что добавление плуроника к системе БР-ХТЗ в водной и PBS среде приводит к уменьшению степени  $r$  анизотропии флуоресценции БР, что может быть связано с рассредоточением (разагрегацией) молекул БР в мицеллах плуроника F108.

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, которое выявляется при АСМ – анализе изображений участков поверхности тонких пленок, образующихся на слюдяной подложке при концентрировании и испарении водных растворов, содержащих указанные компоненты.

### **Практическая значимость**

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

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Установлены 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 трехкомпонентных систем (АК-АП-ПС) от концентрации АП и ПС, соотношения полимерных компонентов в системе и природы АК.

2. Данные  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии об изменении химических сдвигов сигналов протонов молекул АК и ПВП в системах БР-ПВП и МС-ПВП в дейтерированной воде ( $\text{D}_2\text{O}$ ) по сравнению со  $^1\text{H}$ -ЯМР спектрами индивидуальных компонентов.

3. Данные 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.

**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 имени 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.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Антибактериальная фотодинамическая терапия

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – это малоинвазивный метод лечения злокачественных заболеваний, разработанный в шестидесятые годы прошлого века [14, 15]. ФДТ основан на местном или системном применении светочувствительного препарата – фотосенсибилизатора (ФС), который избирательно накапливается в патологических тканях, с последующим облучением пораженного участка светом с длиной волны, соответствующей полосе поглощения ФС, что приводит к фотоповреждению и гибели больных клеток [14, 16, 17]. Цитотоксическими агентами в ФДТ являются активные формы кислорода (АФК), прежде всего синглетный  $^1O_2$  кислород [5, 18]. ФДТ, в отличие от традиционных методов лечения злокачественных новообразований (хирургия, химиотерапия и лучевая терапия), практически не имеет серьезных побочных эффектов. Данную процедуру можно проводить в амбулаторных условиях коротким курсом лечения [19, 20].

Фотодинамическая терапия оказалась одним из эффективных и альтернативных методов борьбы с локальными воспалениями инфекционной природы, вызываемыми патогенными микроорганизмами (бактерии, вирусы, грибы), устойчивыми ко многим лекарственным препаратам (антибактериальная фотодинамическая терапия – АФДТ) [21]. Для лечения или предотвращения бактериальных инфекций традиционно используются антибиотики. Однако в последние годы резистентность микроорганизмов к антибиотикам становится все более серьезной проблемой, особенно в случае больничных инфекций. Применение АФДТ в *in vitro* и *in vivo* экспериментах показало, что в процессе лечения у патогенов не развивается резистентность к фотосенсибилизаторам [22, 23]. Иными словами, длительное применение АФДТ не приводило к выработке устойчивости к данному методу у штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий. АФДТ более эффективна в инактивации

грамположительных бактерий, поскольку внешняя часть их клеточной стенки состоит из пористого слоя пептидогликана и тейхоевых кислот, что позволяет ФС достигать цитоплазматической мембраны (рис. 1) [4]. Напротив, грамотрицательные бактерии имеют гораздо более сложную морфологию. Внешняя часть их клеточной стенки, помимо тонкого пептидогликанового слоя, содержит отрицательно заряженный липополисахарид, липопротеины и белки с пориновой функцией. Эта структурная организация образует физический и функциональный барьер, препятствующий включению ФС внутрь клетки [24].

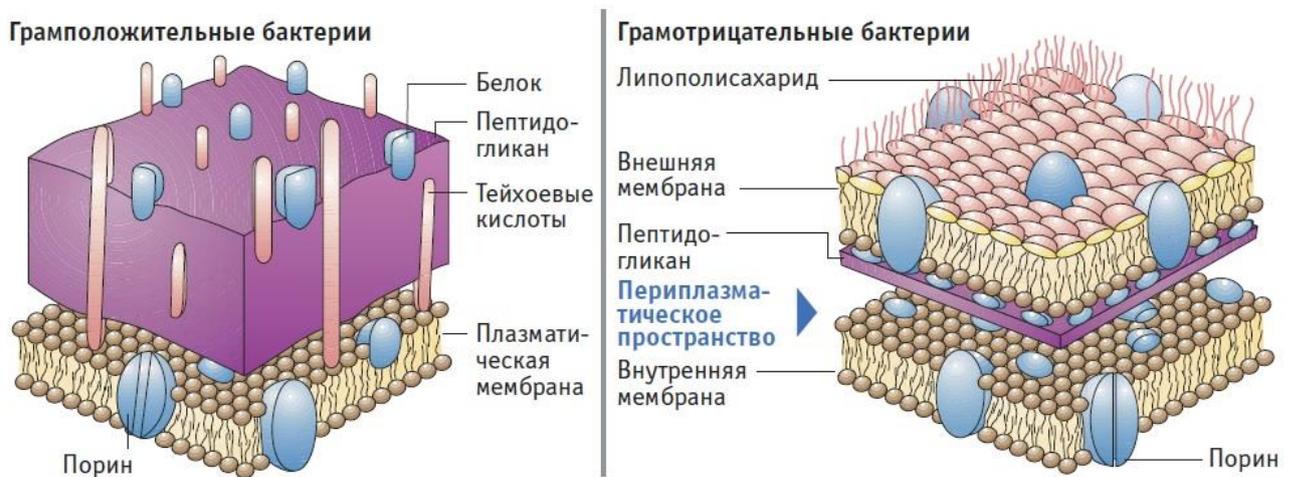


Рисунок 1. Строение клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий

Патогенные клетки (бактериальные, вирусные), как и раковые, способны аккумулировать фотосенсибилизатор, что очень способствовало развитию метода АФДТ [25].

Совсем недавно было обнаружено, что некоторые хронические инфекции вызваны разрастанием бактерий в единую систему – биопленку. Антибиотики практически не способны убить бактериальные биопленки, что связано с неспособностью данных препаратов проникать внутрь такой системы [26]. АФДТ эффективно искореняет не только планктонные клетки, но и биопленки [27]. Кроме того, метод АФДТ применяется в борьбе с вирусами, грибами и

паразитами при использовании ФС различной природы в микромолярном диапазоне [28].

В настоящее время АФДТ используется для лечения местных инфекций, в частности, в стоматологии при борьбе с бактериальными заболеваниями полости рта [29]. С созданием новых и улучшением свойств существующих ФС, а также с развитием оптических технологий АФДТ может стать одним из перспективных методов лечения локальных бактериальных инфекций (трофические язвы, хронические раны, ожоги), особенно заболеваний, вызываемых микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью [30, 31].

### 1.1.1. Механизмы АФДТ

Вне зависимости от того, для каких целей применяется ФДТ (онкология или вирусные/бактериальные заболевания), механизмы фототоксического действия остаются неизменными [20, 32]. Существуют два основных механизма фотодинамической реакции [12, 27, 33]. Первый этап в обоих случаях аналогичен и наглядно иллюстрируется диаграммой Яблонского (рис. 2). Молекула ФС является синглетной в основном состоянии ( $^1\text{ФС}$ ). Поглощение ФС фотонов света с длиной волны, соответствующей полосе поглощения в спектре фотосенсибилизатора, ведет к возбуждению одного из его электронов и переходу на более высокоэнергетическую орбиталь. ФС в синглетном возбужденном состоянии ( $^1\text{ФС}^*$ ) нестабилен (время жизни  $10^{-8}$  с) и теряет часть энергии либо в виде испускания света (флуоресценция), либо в виде диссипации [34]. Кроме того,  $^1\text{ФС}^*$  путем интеркомбинационной конверсии может перейти в более устойчивое возбужденное триплетное состояние (время жизни  $10^{-3}$  с) с параллельными спинами ( $^3\text{ФС}^*$ ) [15, 18]. Согласно механизму I ФС в возбужденном триплетном состоянии путем отрыва электрона или атома водорода передает энергию биомолекулам организма – субстратам (Суб), что приводит к образованию свободных радикалов или анион/катион-радикалов ФС и субстрата. Образовавшиеся радикалы могут прореагировать с кислородом в основном триплетном состоянии ( $^3\text{O}_2$ ) с образованием активных форм кислорода, а именно

анион-радикал супероксида ( $O_2^{\cdot-}$ ), перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) и гидроксил-радикала ( $OH^{\cdot}$ ) [5, 35]. Запущенный каскад реакций приводит к процессу разрушения микроорганизмов.

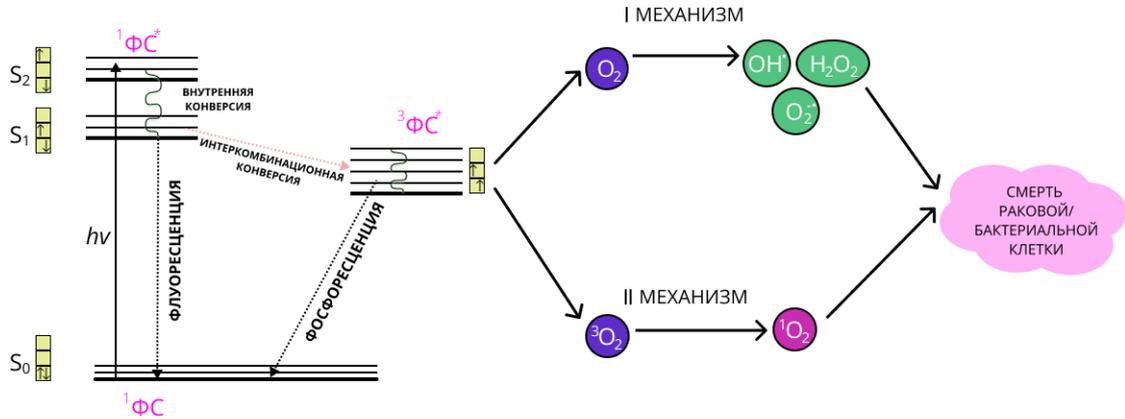
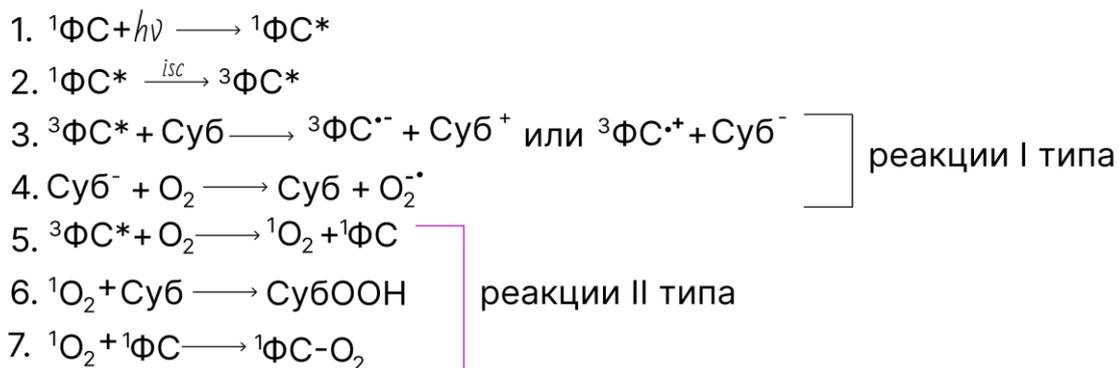


Рисунок 2. Диаграмма Яблонского. Возбужденные состояния ФС и различные формы кислорода

По механизму **II** фотодинамической реакции происходит прямая передача энергии от  $^3\text{ФС}^*$  к кислороду ( $^3O_2$ ) с образованием синглетной формы кислорода  $^1O_2$ . Синглетный  $^1O_2$  кислород тоже может взаимодействовать с субстратами с образованием перекисных продуктов субстратов [15].

I и II механизмы фотодинамического действия ФС могут быть представлены следующим образом [36]:



Здесь  $^1\text{ФС}^*$ ,  $^3\text{ФС}^*$  – синглетное и триплетное возбужденные состояния ФС; *isc* (intersystem crossing) – интеркомбинационная конверсия; Суб – субстрат;  $\text{ФС}^{\cdot+}$  и  $\text{ФС}^{\cdot-}$  – катион и анион-радикал ФС;  $^1\text{ФС}-O_2$  – окисленный (деактивированный) ФС.

АФК вызывают гибель бактериальных клеток через окисление мембранных липидов, ферментов и аминокислот в белках, сшивание белков и окислительное повреждение нуклеиновых кислот, что приводит к нарушению нормального функционирования микроорганизма [25]. Считается, что синглетный  $^1O_2$  кислород является основной активной формой кислорода, через которую ФС проявляют свое фотодинамическое действие [2, 37]. Однако по какому механизму пойдет протекание АФДТ в микроорганизме зависит от множества факторов, в том числе природа ФС и внутриклеточная локализация фотоактивного соединения [2, 25].

### 1.1.2. Фотосенсибилизаторы

Фотосенсибилизатор (ФС) является ключевым компонентом в методе АФДТ. ФС – это вещество, которое способно поглощать свет определенной длины волны, соответствующей положению его полосы поглощения в электронном спектре поглощения (ЭСП), что, как было показано выше, приводит к фотофизическим и фотохимическим реакциям [2, 38]. Как и любой другой препарат, использующийся в клинической практике, фотосенсибилизатор должен обладать определенными свойствами для успешного применения в АФДТ. Основными характеристиками «идеального» ФС являются [27, 32, 38, 39]:

- воспроизводимая химическая структура с высокой степенью химической чистоты;
- стабильность при комнатной температуре;
- недорогой, простой в осуществлении синтез вещества;
- высокая фотохимическая активность, полоса поглощения при длинах волн 600 нм – 800 нм, что необходимо для глубокого проникновения света в ткани;
- высокий квантовый выход АФК;
- отсутствие темновой токсичности.

Существует определенное количество ФС-агентов, которые применяют в АФДТ. Наиболее нетоксичными и эффективными являются порфириновые соединения. Условно ФС можно разделить на две группы: *порфирины и их*

аналоги и ФС непорфириновой структуры (рис. 3). Порфириновые соединения и их аналоги – наиболее большая и изученная группа фотосенсибилизаторов.

### Порфирины и их аналоги

Термин «порфирин» происходит от древнегреческого слова «порпура», что означает «фиолетовый/пурпурный». Порфирины являются большой группой флуоресцентных интенсивно окрашенных пигментов, которые могут быть природного или синтетического происхождения. Порфирин – это ароматическое макроциклическое соединение, состоящее из четырех пиррольных колец, которые связаны между собой метиновыми мостиками в  $\alpha$ -положении (рис. 4 а) [40].

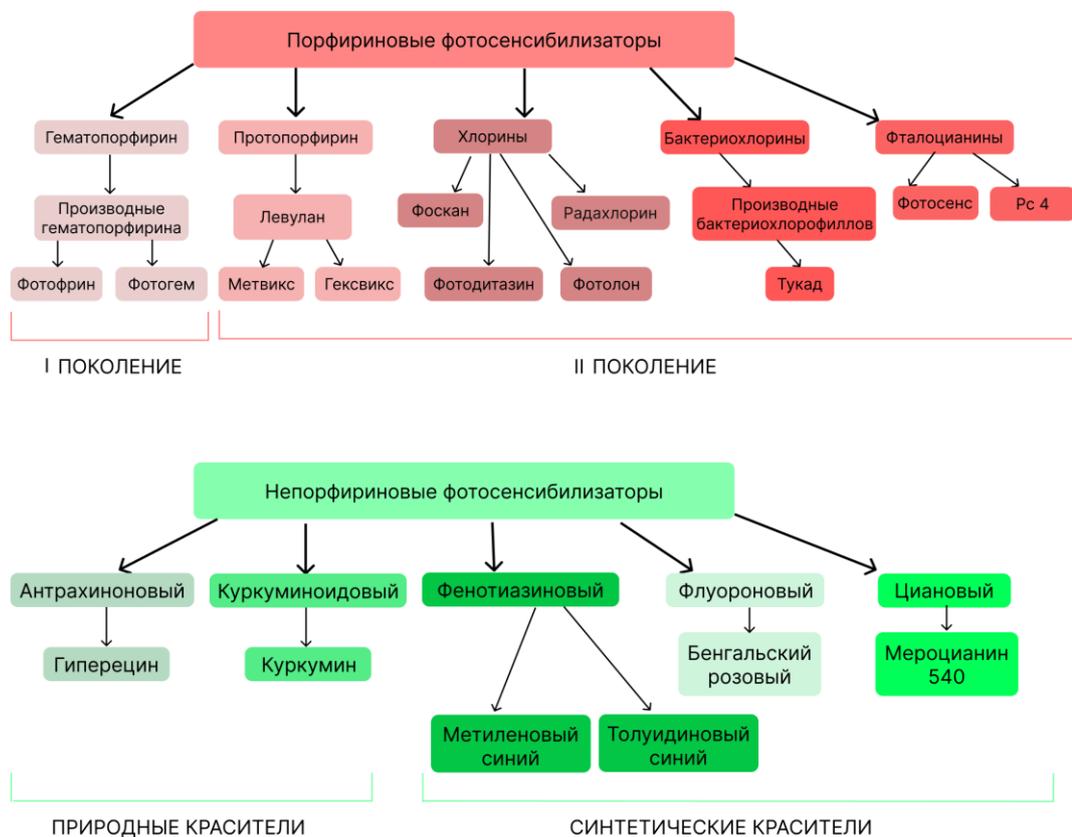


Рисунок 3. Классификация ФС порфириновой и непорфириновой структуры

Фотофрин (порфимер натрия) – это мономерные и олигомерные производные гематопорфирина, препарат известен как единственный фотосенсибилизатор *первого* поколения, введенный в клиническую практику доктором *T. J. Dougherty* и его коллегами в 70-х годах XX века в Америке (рис. 4

б) [41]. Фотофрин используется в клинической практике при лечении различных видов онкологических заболеваний: рака головного мозга, кишечника, шейки матки, кожи и т.д. [42, 43]. Фотофрин также успешно подавляет развитие грибов рода *Candida* различного вида, как в планктонной форме, так и в биопленке [44]. Кроме того, фотофрин демонстрирует противомикробную эффективность в отношении грамположительных бактерий вида «золотистый стафилококк» [3]. Однако неопределенный химический состав ФС, а также наблюдаемые побочные эффекты при его использовании, в частности, гиперчувствительность кожи к свету в течение нескольких недель после ФДТ-процедуры и длительный период полувыведения фотофрина из организма пациентов, подвигли к исследованию новых соединений и разработке ФС агентов *второго* поколения [22, 33].

Синтезированы ФС *второго* поколения для преодоления ряда недостатков фотофрина и приближения к «идеальному кандидату» для применения при лечении онкологических заболеваний методом ФДТ [12, 39, 45]. Однако в этой группе лишь небольшая часть ФС нашла применение в АФДТ. 5-аминолевуиновая кислота и ее производные формы, а также производные хлорина, бактериохлорина и фталоцианина исследованы *in vitro* и *in vivo* экспериментах при борьбе с грибковыми и микробными инфекциями (рис. 4, в – д). Используя данную группу фотоактивных соединений, к сожалению, не удастся полностью обезвредить грибковые и грамотрицательные патогены [35, 46]. Клинические испытания показали, что 5-аминолевуиновая кислота имеет низкую противогрибковую эффективность, а также вызывает рецидивы и иные побочные эффекты [47].

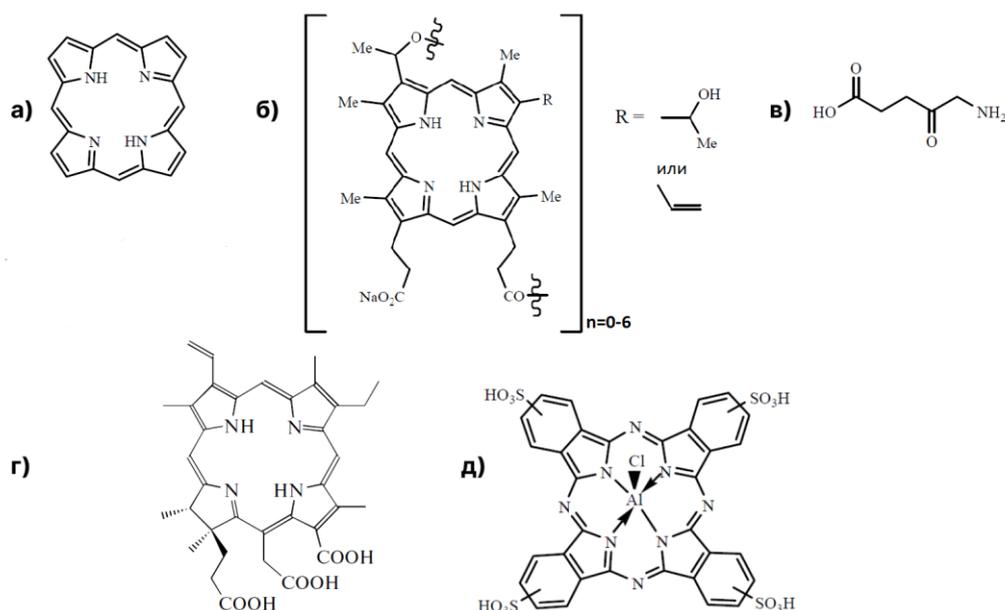


Рисунок 4. Структурная формула порфирина (а), фотофрина (б), 5-аминолевулиновой кислоты (в), фотодитазина (хлориновый ФС) (г) и фотосенса (фталоцианин) (д)

### Красители

В последние годы наряду с порфириновыми соединениями в качестве фотосенсибилизаторов в АФДТ используются красители, в структуре которых имеются ароматические циклы и сопряженные двойные связи [5, 39, 48, 49]. Кроме того, для лечения гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей методом АФДТ исследуются антраценовые красители (АК). АК – это синтетические и природные соединения, с и без гетероатомами в составе антраценового ядра, а также с различными заместителями в  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  положениях [6].

К группе красителей с ФС-свойствами относятся **антрахиноновые (гиперин), куркуминоидные (куркумин), флуороновые (бенгальский розовый), фенотиазиновые (метиленовый синий и толуидиновый синий) и цианиновые (мероцианин 540)** соединения (рис. 5, а – г).

Бактерицидная природа красителей усиливает фотодинамический эффект при АФДТ локальных инфекций бактериального и вирусного характера [7, 48 – 52].

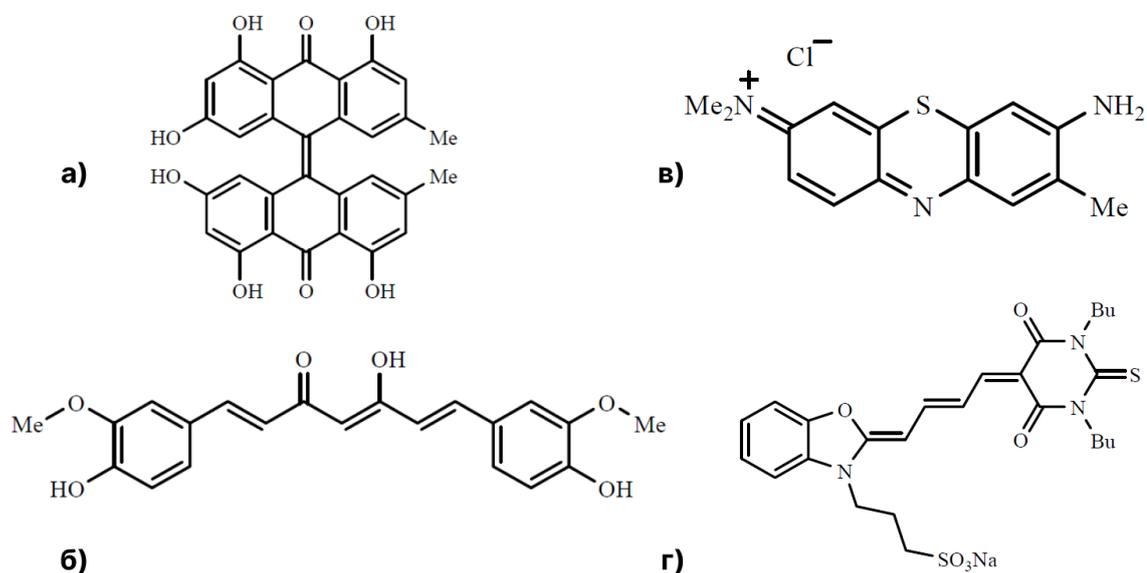


Рисунок 5. Структурная формула гиперееина (а), куркумина (б), толуидинового синего (в) и мероцианина 540 (г)

Следует отметить, что анионные (бенгальский розовый, эозин) и нейтральные ФС (фотофрин, хлорин  $e_6$ , куркумин, гиперееин) обычно применяют при лечении поверхностных инфекций, вызванных грамположительными бактериями. Отрицательно заряженный слой полисахарида не позволяет накапливаться анионным и нейтральным ФС внутри грамотрицательных клеток. Для решения данной проблемы либо синтезируют новые катионные порфирины, либо используют данные ФС в комплексе с катионными носителями [23, 26, 52 – 55].

Катионные антраценовые красители, такие как метиленовый синий, толуидиновый синий, в методе АФДТ эффективно воздействуют на микроорганизмы любой природы. Однако из-за склонности красителей к образованию прочных ассоциатов [56, 57] для получения желаемого эффекта используются высокие дозы облучения и большие концентрации препарата,

которые оказывают токсическое действие не только на больной участок, но и на весь организм пациента [7, 48].

Таким образом, непорфириновые ФС пока не нашли широкого применения в качестве ФС при лечении локальных инфекций методом АФДТ [2]. Для повышения интереса к использованию в качестве ФС в АФДТ красителей, привлекательность которых связана с невысокой (по сравнению с порфириновыми соединениями) стоимостью и достаточно высокими квантовыми выходами фотогенерации  $^1O_2$  ( $\Phi_{\Delta} \sim 0,6$ ), необходимо повысить фотосенсибилизирующую активность красителей. Одним из таких путей является использование красителей в комплексе с амфифильными полимерами, которые способны разагрегировать агрегаты молекул гидрофобных красителей. Другой путь повышения эффективности АФДТ – использование биологически активных соединений, обладающих бактерицидными свойствами, совместно с АФДТ в качестве дополнительного воздействия на длительно незаживающие раны. Такой синергизм может серьезно повысить эффективность антимикробной фотодинамической обработки.

## 1.2. Бенгальский розовый и его физико-химические свойства

Бенгальский розовый (БР) – это полициклический галоидированный углеводород (ксантен), в структуре которого присутствует карбоксильная группа, придающая ему водорастворимость. БР относится к классу флуороновых красителей. Наиболее известный представитель флуороновых красителей – флуоресцеин и его галогензамещенные формы (эозин Y, эритрозин B, бенгальский розовый) (рис. 6). Бенгальский розовый впервые был синтезирован *R. Ghnem* в конце 19 века для применения красителя в тканевой промышленности (патент № 32584, Германия) [8, 56]. Анионный краситель получил такое название в честь древней атрибутики, а именно красной точки в центре лба у замужних индийских женщин, проживающих в Бенгальском регионе Индии [56].

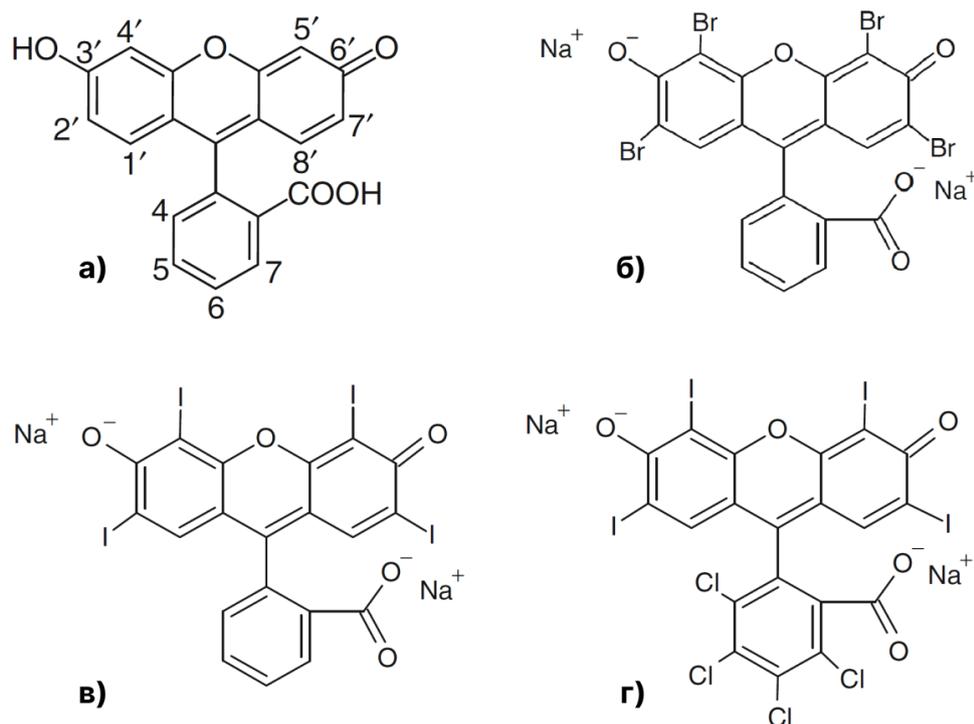


Рисунок 6. Химическая структура флуоресцеина (а), эозина Y (б), эритрозина В (в) и бенгальского розового (г)

Для получения БР в форме **4,5,6,7-тетрахлор-2',4',5',7'-тетраиодфлуоресцеина** сначала синтезируют 4,5,6,7-тетрахлорфлуоресцеин (введение молекул хлора в молекулу флуоресцеина), а затем обрабатывают элементарным йодом. Наконец щелочной гидролиз используется для получения динатриевой соли бенгальского розового, в форме которой он применяется. Эти манипуляции приводят к повышению растворимости красителя в водном и спиртовом растворе [56].

Основные физико-химические свойства БР в водном и спиртовом растворе представлены в таблице 1. Благодаря хорошей растворимости в воде, высокому квантовому выходу генерации синглетного  $^1O_2$  кислорода ( $\Phi_\Delta = 0,76$  в воде) и долгоживущему триплетному возбужденному состоянию ( $t_{1/2}$  0,1 – 0,3 мс) БР является одним из наиболее изучаемых фотосенсибилизаторов для последующего его использования в ФДТ при лечении заболеваний онкологического и локально-бактериального характера [8, 29].

Таблица 1. Основные характеристики БР

ММ, г/моль	$\lambda_{\max}$ (нм) в воде	$\lambda_{\max}$ (нм) в спирте	$\tau_f$ (нс) в воде	$\varphi_{BR}$ в воде	$\Phi_{\Delta}$ в воде	$\Phi_{\Delta}$ в спирте
1017,6	550	557	0,5	0,09	0,75 – 0,76	0,86

где  $\tau_f$  – время жизни флуоресценции;

$\varphi_{BR}$  – квантовый выход флуоресценции БР;

$\Phi_{\Delta}$  – квантовый выход генерации синглетного  $^1O_2$  кислорода

Антимикробная активность фотоактивированного БР изучена на различных видах микроорганизмов [52, 58, 59]. В работе *T. N. Demidova* и *M. R. Hamblin* показано, что БР более эффективен при борьбе с золотистым стафилококком (*S. Aureus*) и кишечной палочкой (*E. Coli*), чем фенотиразиновый краситель толуидиновый синий [52]. Однако анионная природа и слабо выраженная липофильность БР существенно ограничивают применение красителя при борьбе с планктонными формами бактерий, имеющими отрицательный потенциал заряда на внешней поверхности клетки [53]. Добавление солей и полимерных носителей к раствору БР существенно повышает эффективность АФДТ, что приводит к понижению жизнеспособности бактерий [59, 60].

### 1.2.1. Спектральные свойства бенгальского розового

В электронном спектре поглощения (ЭСП) бенгальского розового присутствует несимметричная интенсивная полоса поглощения с  $\lambda = 550$  нм, которую относят к мономерной форме анионного красителя, и «плечо» ( $\lambda_{\text{плечо}}$ ) в области 515 нм – 520 нм, которое соответствует димерной форме БР [56, 61]. Полоса флуоресценции анионного красителя всегда сдвинута в длинноволновую область спектра на 10 – 20 нм по отношению к полосе поглощения БР (рис. 7).

В ходе ряда работ изучено влияние растворителей на спектральные свойства бенгальского розового [56, 62 – 64]. Показано, что у БР наблюдается отрицательный сольватохромный эффект (гипсохромный сдвиг ЭСП и спектра флуоресценции красителя при увеличении полярности растворителя) (таблица 2). Спектральные изменения, очевидно, связаны с образованием водородных связей между растворенным веществом (красителем) и молекулами растворителя [56, 63].

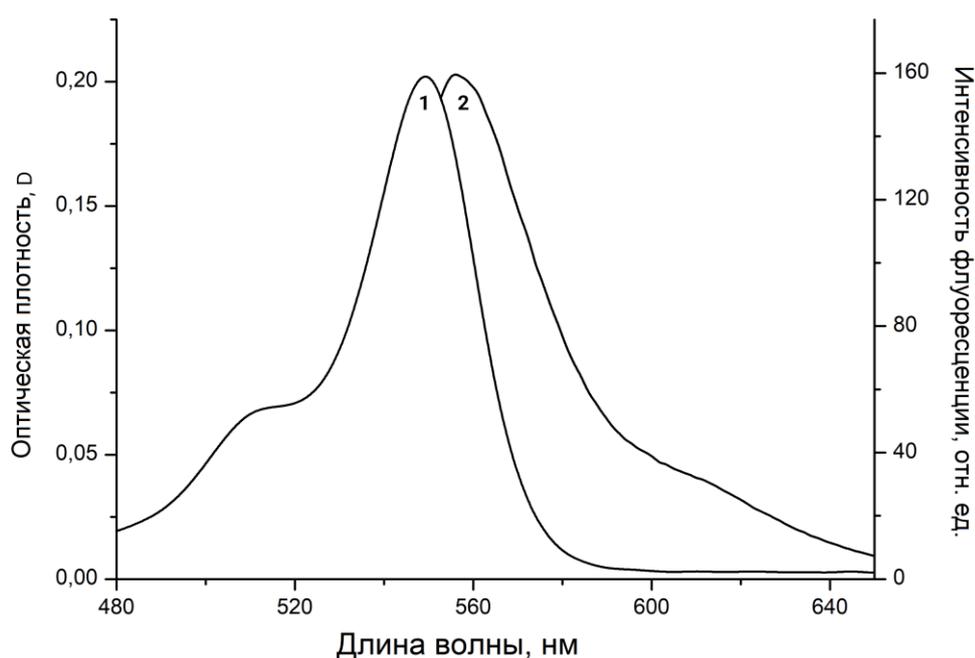


Рисунок 7. Электронный спектр поглощения (1) и спектр флуоресценции (2) водного раствора бенгальского розового  $C = 2 \times 10^{-6}$  М

Кроме того, в зависимости от pH среды бенгальский розовый может существовать в трех таутомерных формах: катионной, нейтральной и анионной (рис. 8), что отражается в ЭСП и спектре люминесценции БР при изменении pH раствора [64, 65]. В работах [66 – 68] показано, что в кислой среде ( $pH \leq 3,5$ ) раствор БР переходит в лактонную (нейтральную) форму, что отражается в отсутствии полос поглощения в видимой области спектра и отсутствии флуоресценции красителя. При добавлении щелочи в прозрачный раствор БР

наблюдается восстановление спектральных свойств у красителя и его окраски (розовый цвет). Данный результат связан с равновесным переходом красителя в дианионную форму в слабощелочной и нейтральной среде раствора (рН = 7 – 8).

**Таблица 2.** Максимумы полос поглощения и испускания бенгальского розового в различных растворителях и основные параметры растворителя [63]

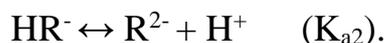
Растворитель	$\lambda$ (нм)		Стоксов сдвиг (нм)	$\pi^*$
	Оптическая плотность (D)	Интенсивность флуоресценции (I)		
Вода	546	567	21	1,09
Диметилсульфоксид	566	579	13	1,00
Диметилформамид	562	575	13	0,88
Ацетонитрил	558	571	13	0,75
Ацетон	562	573	11	0,71
Метанол	556	573	11	0,63
Тetraгидрофуран	560	575	15	0,58
Этанол	558	571	13	0,54
Изопропанол	562	573	11	0,48

где  $\pi^*$  – параметр, характеризующий полярность и поляризуемость растворителя



Рисунок 8. Таутомерные формы бенгальского розового

Причиной существования трех представленных таутомерных форм БР является трехступенчатая диссоциация красителя в растворах (за исключением экстремально кислых и щелочных сред) [69]:



Константы диссоциации для БР составляют  $\text{pK}_{\text{a2}} = 4,9 \pm 0,8$  и  $\text{pK}_{\text{a1}} = 4,0 \pm 0,5$ , что даёт информацию об ионном равновесии бенгальского розового и его таутомерных форм при различных рН средах.

Агрегация БР в водных растворах приводит к увеличению содержания димерных форм ( $\lambda = 515$  нм) по отношению к мономерным ( $\lambda = 550$  нм), что отражается в изменении соотношения оптических плотностей полос поглощения в ЭСП анионного красителя, также наблюдается тушение люминесценции [56, 62]. Как правило, такие изменения происходят при увеличении концентрации БР в полярном растворителе. Так, уже при концентрации  $2 \times 10^{-6}$  М в водном растворе БР частично находится в агрегированном состоянии [62]. Более подробно процесс агрегации бенгальского розового будет рассмотрен в главе «Самоорганизация антраценовых красителей».

Таким образом, основными факторами, влияющими на характер спектров поглощения и флуоресценции красителя, являются природа растворителя, рН среды и концентрация БР в растворе.

### 1.3. Физико-химические свойства метиленового синего

Метиленовый синий или метилтиониния хлорид (МС) – это катионный краситель фенотиазиновой природы. МС представляет собой ароматическое гетероциклическое соединение с химической формулой ( $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), молекулярная масса 319,85 г/моль (рис. 9) [7]. МС относят к гидрофобным катионным соединениям. Однако метиленовый синий обычно находится в солевой форме, что обеспечивает ему растворимость в водных и спиртовых (метанол, этанол, изопропанол-2) средах [70, 71].

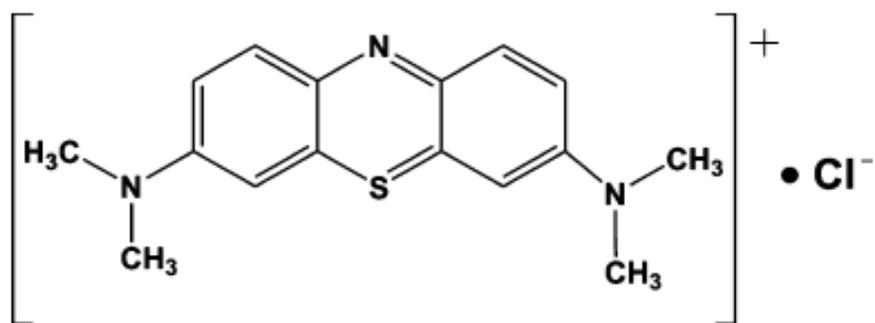


Рисунок 9. Химическая структура метиленового синего

Метиленовый синий – эффективный ФС (квантовый выход генерации синглетного  $^1O_2$  кислорода  $\Phi_\Delta = 0,52$  и время жизни в триплетно-возбужденном состоянии  $t_{1/2} > 0,70$  мкс), который может быть использован в АФДТ при лечении локализованных инфекций на поверхности кожи. Катионный краситель МС обладает фототоксическим противомикробным действием в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также некоторых грибковых и вирусных возбудителей. Он эффективен при лечении методом АФДТ онихолизиса, псориаза, герпетической экземы, красного плоского лишая, герпеса, катарального лингвита [7, 50, 51, 72 – 75]. Клинические испытания показали эффективность метиленового синего при лечении АФДТ пародонтита [76]. Низкая стоимость препарата, стабильность и легкодоступность являются преимуществами для клинического применения МС в качестве ФС в АФДТ. Кроме того, МС относительно нетоксичен для человека и безопасно используется в различных областях медицины уже более века [77].

Однако МС обладает недостаточно высокой эффективностью при лечении хронических бактериальных биопленочных инфекций [78, 79]. Причина связана с природой красителя – МС агрегирует при уже низких концентрациях, что понижает его фотосенсибилизирующие свойства [79]. Несмотря на этот недостаток, МС остается одним из многообещающих «кандидатов» для использования в качестве ФС в АФДТ. Разагрегация метиленового синего является основной задачей для повышения его эффективности при уничтожении бактериальных инфекций, вызываемых биопленками.

### 1.3.1. Спектральные свойства метиленового синего

Метиленовый синий имеет асимметричную интенсивную полосу поглощения в видимой области спектра с максимумом при  $\lambda = 665$  нм (мономеры МС) и небольшое плечо в области 615 – 620 нм, относящееся к димерным формам антраценового красителя, и полосу поглощения при длине волны 292 нм [80]. МС флуоресцирует при  $\lambda = 680 – 690$  нм со стоксовым сдвигом 15 – 25 нм [77] (рис. 10).

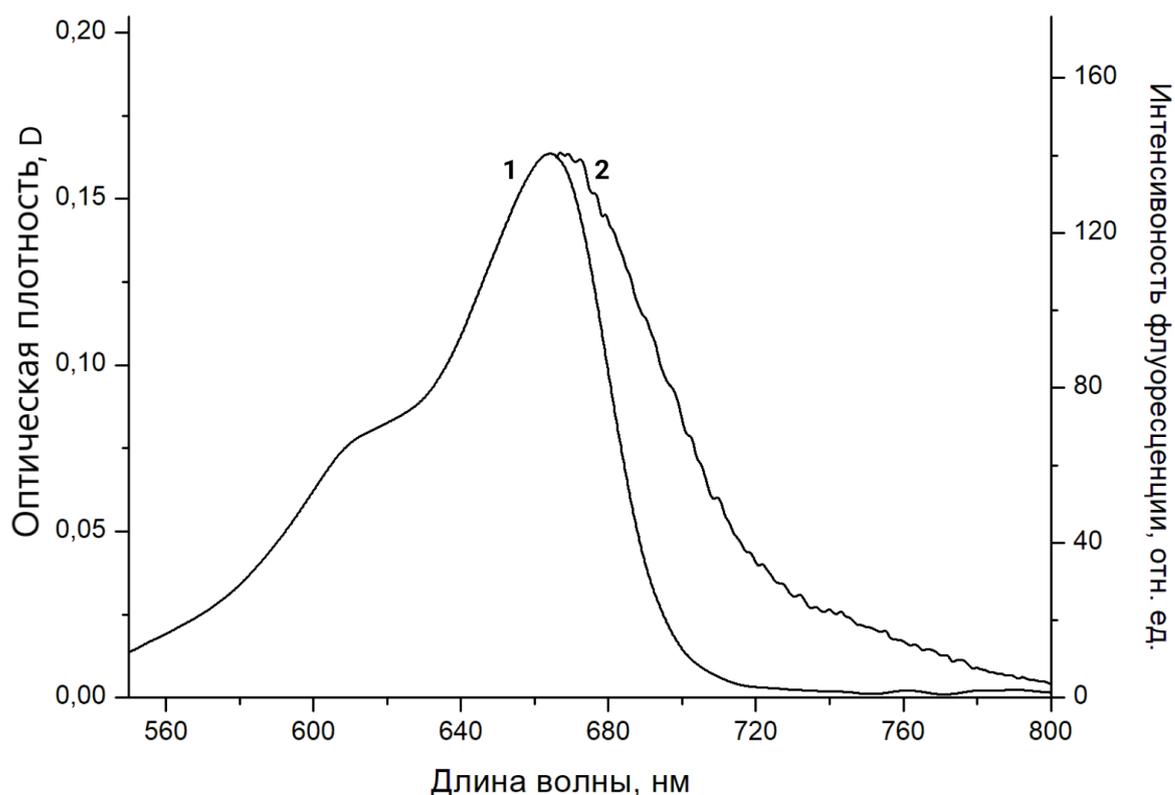


Рисунок 10. Электронный спектр поглощения (1) и спектр флуоресценции (2) водного раствора метиленового синего  $C = 2,5 \times 10^{-6}$  М

Вследствие ионной природы АК вид спектров поглощения МС определяется полярностью растворителя [81, 82]. В работе [82] показано, что  $\lambda_{\max}$  полосы поглощения красителя сдвигается в коротковолновую область спектра при использовании более полярного растворителя (таблица 3). Гипсохромный сдвиг происходит из-за изменения разницы энергий основного и возбужденного состояния МС, которая соответствует  $\pi$ - $\pi^*$  переходу в видимой области [82].

Водородные связи, образующиеся в растворе между молекулами метиленового синего и растворителя, также приводят к спектральным изменениям [81]. Коэффициент молярной экстинкции ( $\epsilon$ ) МС в различных растворителях увеличивается по мере снижения полярности растворителя.

**Таблица 3.** Характеристические данные ЭСП метиленового синего ( $7 \times 10^{-5}$  М) в различных растворителях [82]

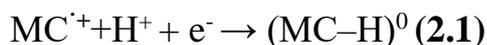
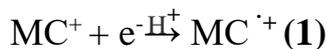
Растворитель	Положение максимума полосы поглощения $\lambda_{\max}$ (нм)	Оптическая плотность, D	Коэффициент молярной экстинкции $\epsilon$ ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )
Вода	667	0,693	64800
Метанол	676	0,864	65237
Этанол	678	1,256	106254
Изобутанол	685	0,345	22409

ЭСП МС претерпевают существенные изменения при проявлении фенотиазиновым красителем редокс-свойств. Метиленовый синий относится к окислительно-восстановительным индикаторам и имеет выраженный темно-синий цвет в окисленной форме ( $MC^+$ ) и бесцветен в восстановленной форме ( $MC-H^0$ ) (лейкоформа МС) (рис. 11) [83].

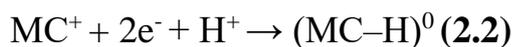


Рисунок 11. Окисленная и восстановленная формы МС [84]

Метиленовый синий может восстанавливаться, переходя в нейтральную лейкоформу. Механизм процесса выглядит следующим образом:

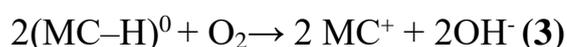


или



В присутствии одного электрона и протона водорода  $\text{MC}^+$  переходит в полувосстановленную форму с образованием катион-радикала  $\text{MC}^{\cdot+}$  (1). Образование обесцвеченной восстановленной формы  $(\text{MC}-\text{H})^0$  (лейкоформы) возможно только с завершением электронного процесса (2.1 или 2.2).

Как правило, для получения лейкоформы МС к окисленному раствору МС добавляют кислоты или дитионит натрия. Однако данная конфигурация является неустойчивой и при взаимодействии с атмосферным кислородом краситель окисляется до положительно заряженного метиленового синего (реакция «синяя бутылка») [85]:



Реакция (3) очень чувствительна к изменению рН раствора и скорость образования катионной формы МС увеличивается с ростом рН среды реакционного раствора [84, 86].

ЭСП полувосстановленной ион-радикальной формы метиленового синего имеет максимум полосы поглощения  $\lambda_{\max}$  при длине волны 420 нм, для восстановленной бесцветной лейкоформы красителя (рН<2)  $\lambda_{\max}$  наблюдается при 256 нм. Наблюдаемые максимумы полос поглощения при длинах волн 232 нм и 690 – 740 нм соответствуют протонированной форме МС (2<рН<7) [70].

Наличие агрегатов в водном растворе метиленового синего наглядно отображаются спектральными изменениями. Так, с повышением концентрации МС и температуры окружающей среды наблюдается рост оптической плотности полосы с  $\lambda = 615$  нм, относящейся к димерным формам антраценового красителя а также наблюдается концентрационное тушение флуоресценции МС [87, 88]. Возможно образование более крупных агрегатов МС – тетрамеров со сдвигом ЭСП МС в коротковолновую область спектра ( $\lambda_{\max} = 600$  нм) [87]. Более подробно о процессе агрегации МС будет рассмотрено далее.

#### 1.4. Самоорганизация антраценовых красителей

Явление самоорганизации красителей в водном растворе изучено различными физико-химическими методами: спектрофотометрией, светорассеянием, полярографией [89, 90]. Результаты данных исследований показали, что, несмотря на отталкивающую силу одноименных зарядов, антраценовые красители склонны к самоагрегации с образованием димеров, тримеров и агрегатов более сложной системы, при этом в агрегированном состоянии заряд у красителя остается неизменным [57]. Молекулы АК в водной среде удерживаются вместе (агрегируют) в основном за счет гидрофобных взаимодействий [90].

Существуют два пути самоорганизации фотосенсибилизаторов в растворах, а именно агрегаты J- и H- типа (рис. 12) [91]. J-тип агрегации образуется при взаимодействии мономерных молекул красителя, которые находятся в одном

пространственном измерении и расположены относительно друг друга «бок о бок» с углом ориентации ( $\theta$ )  $0 - 54,7^\circ$ . Сильное взаимодействие уложенных таким образом мономеров красителя приводит к сдвигу полос поглощения АК в длинноволновую область спектра (батохромный сдвиг) с наблюдаемыми узкими интенсивными полосами поглощения [92]. H-агрегаты образуются при параллельном одномерном расположении молекул красителя «лицом к лицу» с  $\theta = 54,7 - 90^\circ$  [91]. При H-агрегации наблюдается диполярная связь между мономерами, что спектрально отражается в уширении и смещении основных полос поглощения АК в коротковолновую область спектра. Многие красители в агрегированном состоянии J-типа имеют высокое значение интенсивности флуоресценции, их квантовый выход флуоресценции ( $\phi$ ) превосходит  $\phi$  красителя в мономерной форме. В то время как для H-агрегатов наблюдается процесс тушения флуоресценции [91].

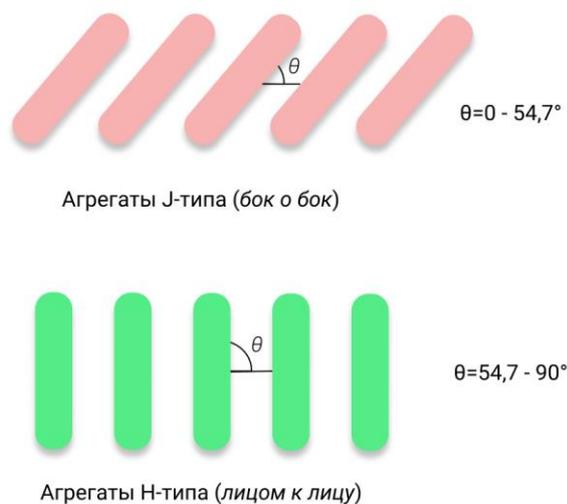


Рисунок 12. Типы самоорганизации красителей в полярных растворителях

Известно, что бенгальский розовый и метиленовый синий в полярных растворителях образуют агрегаты H-типа [56, 62, 87]. Как уже упоминалось, БР и МС имеют максимумы в длинноволновой области спектра,  $D_{max}$  для БР при  $\lambda = 550$  нм и для МС при  $\lambda = 665$  нм, которые относят к мономерным формам красителей, и димерное плечо  $D_{плечо}$  в области 520 нм (БР) и 615 нм (МС). По соотношению  $D_{max}/D_{плечо}$  изучается равновесие димерных – мономерных форм БР

и МС в полярных растворителях. Так, с увеличением концентрации бенгальского розового и метиленового синего в воде (от  $10^{-7}$  до  $10^{-4}$  М) наблюдается зеркально противоположный спектр поглощения: максимум при длине волны 520 нм (БР), 615 нм (МС) и плечо в области 550 нм для БР и 665 нм для МС (рис. 13), т.е. содержание димеров превышает содержание мономерных форм данных АК в растворе [56, 62, 87]. Аналогичная зависимость наблюдается при добавлении солей (NaCl, KCl) в водные растворы антраценовых красителей, т.е. соли способствуют процессу агрегации БР и МС [90]. Интересно, что в случае МС при повышении концентрации больше  $10^{-3}$  М полоса поглощения красителя сдвигается в коротковолновую область спектра с образованием широкого и интенсивного пика при  $\lambda = 600$  нм, что относят к большим агломератам метиленового синего [87].

Электростатическое взаимодействие гидрофобного/ароматического скелета ионного красителя с растворителем считается основной причиной стабилизации агрегатов Н-типа у МС и БР [57].

Следует отметить, что в агрегированном состоянии антраценовые красители менее активны в фотогенерации синглетного  $^1O_2$  кислорода, что отражается в уменьшении эффективности метода АФДТ при использовании высоких концентраций АК [7, 62].

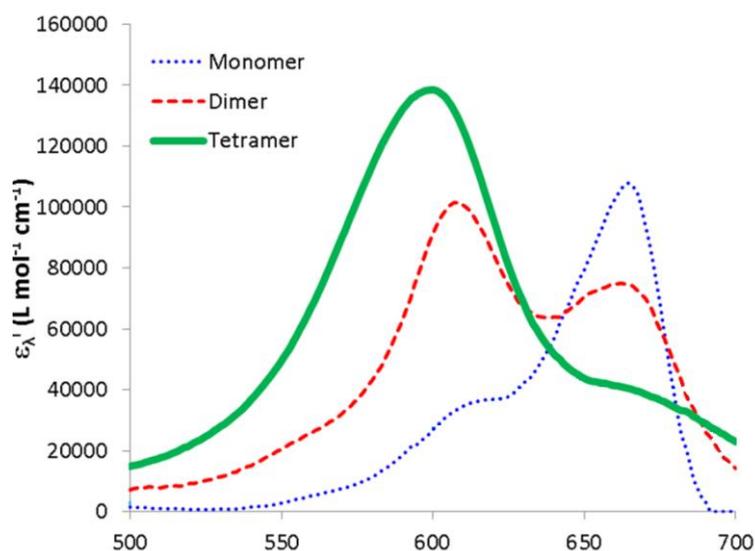


Рисунок 13. ЭСП метиленового синего в воде при разных концентрациях красителя [87]

## 1.5. Амфифильные полимеры

Амфифильные полимеры (АП) – это группа функциональных полимеров, которые имеют как гидрофильные, так и гидрофобные фрагменты в макромолекулах [93]. Их синтезу и применению уделяется особое внимание в связи с их широким применением. Из-за разной совместимости фрагментов к гидрофильным (водным) и гидрофобным растворителям АП склонны к самосборке с образованием сложных надмолекулярных структур – мицелл. Настроивая размер и форму АП, удается получить мицеллы различной морфологии, а именно сферический, палочковидный, пластинчатый и везикулярный [94]. Способность к самосборке в сложные структуры позволяет использовать амфифильные полимеры в качестве носителей в системе доставки лекарственных препаратов, в катализе и др. [94, 95].

### 1.5.1. Плуроники

Полоксамеры (коммерческое название «плуроники») являются мицеллообразующими амфифильными блок-сополимерами, часто используемыми в медицине в качестве солюбилизаторов, поверхностно-активных веществ (ПАВ), эмульгаторов, загустителей [95]. Хотя плуроники не относятся к биоразлагаемым полимерам, благодаря своей амфифильной природе они отфильтровываются и выводятся через почки [96].

По строению плуроник представляет собой неионогенный линейный триблок-сополимер А-В-А типа, имеющий центральное гидрофобное полипропиленоксидное звено (ППО) и гидрофильные полиэтиленоксидные звенья по бокам (ПЭО) с общей химической структурой  $(\text{ПЭО})_x\text{-(ППО)}_y\text{-(ПЭО)}_x$ , где  $x$  и  $y$  означают среднее число звеньев ПЭО и ППО в блок-сополимере (рис. 14) [97].

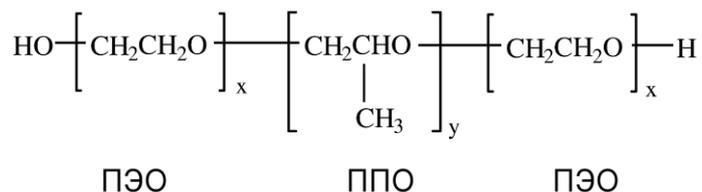


Рисунок 14. Общая структура плуроника. В центре – гидрофобный полипропиленоксид (ППО), который окружен гидрофильными цепями полиэтиленоксида (ПЭО) с общей структурой  $(\text{ПЭО})_x\text{-(ППО)}_y\text{-(ПЭО)}_x$

Плуроники доступны в широком диапазоне молекулярных масс. Номенклатура коммерческого продукта плуроника состоит из буквы, которая указывает на физическое состояние полимера (Р – паста, L – жидкость и F – твердый) и 2 – 3 цифр, где первые 2 цифры обозначают ММ блока ППО, поделенную на 300, последняя цифра – процентное содержание ПЭО, поделенное на 10 [98].

В водном растворе макромолекулы плуроника (унимеры) самоорганизуются в сферические или эллипсоидные мицеллы с гидрофобным внутренним ядром и гидрофильной внешней оболочкой (рис. 15). Образование мицелл «ядро-оболочка» молекулами плуроника зависит от критической концентрации мицеллообразования (ККМ) и критической температуры мицеллообразования (КТМ) [99, 100]. В зависимости от соотношения ПЭО/ППО звеньев плуроник склонен к образованию мицелл при концентрации от  $10^{-7}$  до  $10^{-3}$  М и при температуре 20 – 40 °С [101]. ККМ и КТМ зависят от содержания ППО блоков в молекуле плуроника. В работах [93, 99] показано, что с увеличением содержания гидрофобных участков в молекуле блок – сополимера мицеллы образуются при более низких концентрациях плуроника в водном растворе и более низкой температуре полимерного раствора. При неизменном

соотношении ППО/ПЭО ККМ и КТМ уменьшаются с ростом молекулярной массы блок – сополимера [99, 102].

Размер мицелл плуроника в полярном растворителе составляет 8 – 20 нм, что считается предпочтительным диапазоном для фармацевтических задач [98]. Радиус мицелл практически не меняется при линейном увеличении молекулярной массы полимера и температуры окружающей среды [101, 102].

В зависимости от концентрации, температуры и состава плуроника могут образовываться различные надмолекулярные структуры. Так, при ККМ и КТМ помимо сферических мицелл возможно образование мицелл цилиндрической или палочкообразной формы (рис. 15) [93, 103]. При дальнейшем повышении концентрации и температуры плуроник становится гелем с кубической или гексагональной упаковкой, для которого существуют определенная критическая концентрация гелеобразования (ККГ) и критическая температура гелеобразования (КТГ) (рис. 15) [103].

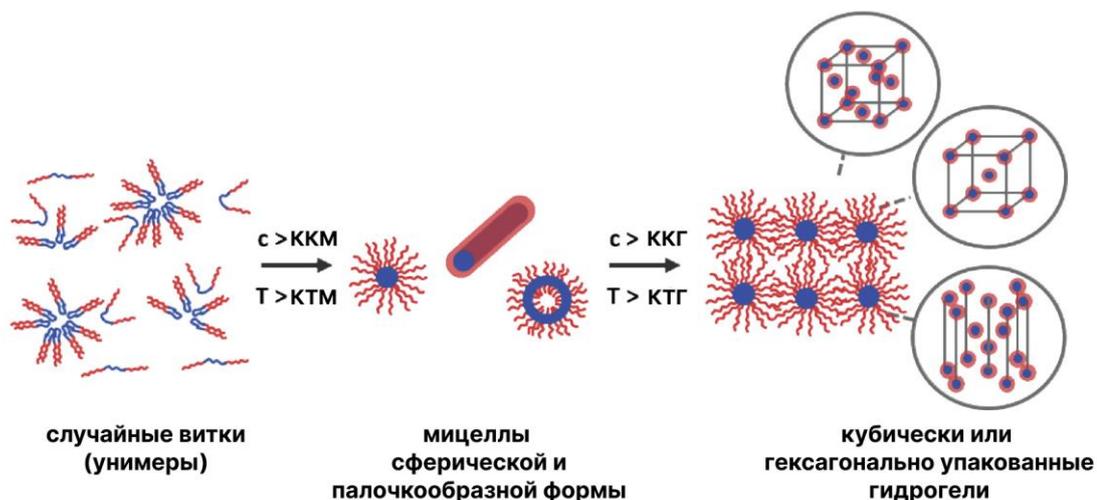


Рисунок 15. Изменения надмолекулярной структуры плуроника в водном растворе при изменении концентрации и температуры полимерного раствора [103]

Помимо температуры и концентрации, на мицеллярную структуру блок-сополимера оказывает существенное влияние рН среды [98]. При добавлении HCl различной концентрации (1 М – 3 М) в водный раствор плуроника P123 мицеллы

агрегируют [104]. Причем размер агрегатов мицелл плуроника увеличивается с увеличением содержания кислоты в блок – сополимерном растворе. Образование мицеллярных агрегатов связано с тем, что в кислой среде увеличивается число водородных связей между полимером и молекулами воды. Причем в присутствии 3М-ой соляной кислоты наблюдается образование мостиков между протонированными молекулами воды и атомами кислорода гидрофильной внешней оболочки мицеллы плуроника (ПЭО блок), что и приводит к процессу агрегации мицелл блок – сополимера в кислой среде [104].

Плюроники считаются низкотоксичными веществами [105, 106]. Токсичность плуроника увеличивается с увеличением содержания гидрофобных звеньев в молекуле блок-сополимера. Однако даже самый гидрофобный плуроник L61 является практически нетоксичным соединением по сравнению с некоторыми низкомолекулярными ПАВ [107].

Помимо доставки лекарственных средств плуроники применяются в различных областях медицины: лечение ожогов, как эмульсионный компонент при криоконсервации различных культур клеток, органов и тканей. Плюроники входят в состав медицинских средств для создания искусственных заменителей крови [108, 109].

### **1.1.1. Поли-*N*-винилпирролидон**

Поливинилпирролидон (ПВП), также известный под названиями «повидон» или «поливидон», представляет собой гигроскопический аморфный синтетический полимер, который получают методом радикальной полимеризации мономера *N*-винилпирролидона [110 – 112]. ПВП обладает уникальными физико-химическими свойствами: инертный, неионогенный и термостойкий [111, 113]. Поливинилпирролидон – это гидрофильный полимер, однако он отлично растворяется в растворителях разной полярности (низшие спирты, хлорорганические растворители, кислоты, амиды) [110, 112, 114, 115]. Молекулярная масса ПВП варьируется в интервале от 2,5 до 2900 кДа [111]. Различные марки ПВП шифруют буквой *K* в диапазоне вязкостей 10 – 120 Па\*с,

что соответствует концентрации 1 – 5 % полимерного раствора в воде при комнатной температуре. Поливинилпирролидон широко применяется в фармацевтике, регенеративной медицине, косметологии и в различных областях промышленности [112 – 115].

Поливинилпирролидон способен сорбировать молекулы воды. Для макромолекулы ПВП сорбция воды имеет специфический характер. Гидратные оболочки возникают в результате физико-химического взаимодействия ПВП с водой, а именно образуются водородные связи между молекулами воды и группами  $-N-C=O$  молекул ПВП (рис. 16) [110, 116]. В работах *P. Molyneux* и *K. Suvegh* было отмечено, что пирролидоновое кольцо может быть окружено 55 молекулами воды в виде гидратных слоев, связанных водородными связями [117, 118]. Степень поляризации молекул воды зависит от расстояния до поляризованных функциональных групп. Молекулы воды, которые находятся на большом расстоянии от  $-N-C=O$  групп пирролидоновых циклов не взаимодействуют с ними, их удерживают водородные связи внутри предшествующих гидратных оболочек [110, 116, 119]. Молекулы воды, удерживаемые гидрофильными фрагментами цепей ПВП, находятся в непосредственной близости от активных комплексообразующих центров. Эти молекулы могут оказывать существенное влияние на межмолекулярное взаимодействие ПВП с другими соединениями. Во многих работах показано, что молекулы ПВП в водном растворе образуют комплексы с соединениями различной природы, включая ионы металлов, неорганические ионы, заряженные органические молекулы, природные и синтетические полимеры [110, 120, 121]. При использовании ПВП в качестве полимера-носителя в системах направленной доставки лекарств благодаря его способности образовывать комплексы с различными веществами улучшаются функциональные свойства фармацевтических препаратов, а именно поливинилпирролидон повышает растворимость, скорость доставки, стабильность и биодоступность лекарств различного состава [115, 122, 123].

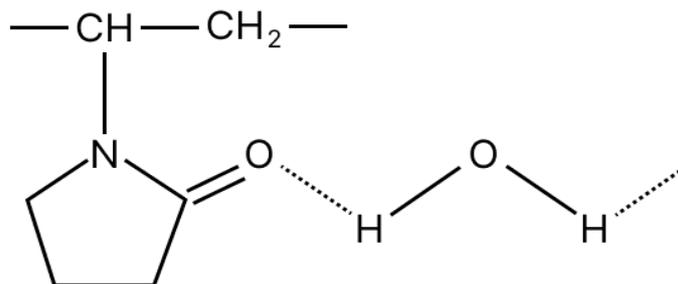


Рисунок 16. Водородные взаимодействия поливинилпирролидона с водой

В водных растворах в зависимости от условий макромолекулы ПВП могут принимать различные конформационные состояния. Так, водный раствор ПВП при комнатной температуре имеет конформацию макромолекулярного клубка. В данной форме макромолекулы поливинилпирролидона образуют спиралевидную структуру, где гидрофобные звенья полимера обращены внутрь, а гидрофильные фрагменты находятся снаружи. Однако при повышении температуры полимерная цепь сжимается до плотной упаковки – глобулы (рис. 17). Переход клубок-глобула обусловлен гидрофобными взаимодействиями между молекулами полимера, а именно наблюдаются отталкивающие взаимодействия между звеньями ПВП и молекулами воды [124].

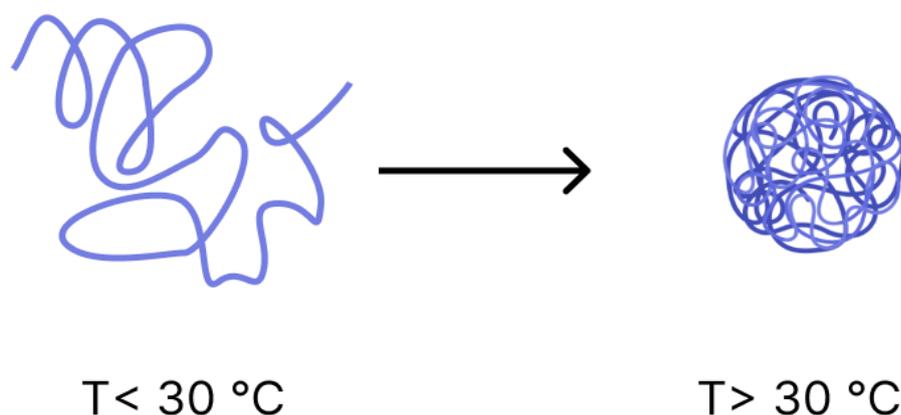


Рисунок 17. Переход клубок-глобула макромолекул ПВП в водном растворе при изменении температуры

По фармакокинетическим свойствам ПВП – биосовместимый и гемосовместимый препарат [125, 126]. Скорость выведения ПВП из организма зависит от молекулярной массы полимера. Установлено, что ПВП нетоксичен, не вызывает раздражения, сенсibilизации и, следовательно, полностью безопасен для использования в пищевой и в медицинской области [112].

### 1.5.3. Полиэтиленгликоль

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) – это неионный, неиммуногенный и биосовместимый полимер, состоящий из повторяющихся звеньев этиленгликоля  $[\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_n-\text{OH}]$ , который получают полимеризацией окиси этилена или этиленгликоля в условиях щелочного катализа [127, 128]. Синтезируют ПЭГ различной молекулярной массы. Обычно ПЭГ в виде олигомера или полимера с ММ ниже 20 000 г/моль применяется в биомедицине [127]. Низкомолекулярный ПЭГ представляет собой смесь олигомеров с широким диапазоном молекулярной массы [128]. В зависимости от ММ ПЭГ может быть жидким, пастообразным или твердым кристаллическим веществом [129].

Как и ПВП, полиэтиленгликоль склонен к гидратации – образованию водородных связей между атомами кислорода в макромолекулах полимера и молекулами воды [130]. Подобное взаимодействие способствует формированию «водной оболочки» вокруг молекул ПЭГ (около 3 молекул воды приходится на одну молекулу полиэтиленгликоля), что приводит к увеличению гидродинамического радиуса полимера. Гидратирующая способность ПЭГ зависит от ММ полимера, а именно чем больше звеньев полиэтиленгликоля, тем больше молекул воды взаимодействует с ПЭГ [131]. Данное свойство полимера используется для стабилизации белков, улучшения всасывания препаратов сквозь клеточные мембраны [128].

По данным Рамановской спектроскопии, рефрактометрии, дифференциальной сканирующей калориметрии, методом математического моделирования определены конформационные состояния макромолекул ПЭГ в водном растворе. С увеличением ММ ПЭГ, концентрации полимерного раствора

и температуры окружающей среды полимер переходит от вытянутой цепочечной структуры в спиралевидную форму (конформация макромолекулярного клубка) [132].

Благодаря амфифильной природе (высокая растворимость как в воде, так и в органических растворителях) ПЭГ способен солюбилизовать биологические соединения в целях их применения в медицине для контролируемой доставки лекарственных средств [128].

Полиэтиленгликоль имеет линейную структуру. Для эффективного связывания лекарственных препаратов разной природы с полимером синтезируют ПЭГ различной надмолекулярной структуры (разветвленный, звездчатый, дендримерный) [133]. Ковалентная конъюгация ПЭГ с молекулами (метод ПЭГилирования) применяется для улучшения физико-химических свойств препарата [133, 134]. Модифицированный ПЭГ часто используется для ПЭГилирования пептидов, белков, фолиевой кислоты, наночастиц, вирусов и ферментов [134 – 136]. ПЭГилированные соединения используются в фармакологии, регенеративной медицине, а также применяются при культивировании клеток и для заживления ран [134, 137, 138].

Следует отметить также, что ПЭГ инертен для организма и выводится в неизменном виде через почки [139].

### **1.6. Полисахариды и их антибактериальные свойства**

Полисахариды (ПС) – это линейные или разветвленные биополимеры, которые состоят из 10 и более моносахаридных остатков, соединенных гликозидными связями. Полисахариды выделяют из природных материалов животного или растительного происхождения [140]. Материалы на основе ПС нашли широкое применение в тканевой инженерии и регенеративной медицине, поскольку они обладают высокой антибактериальной и противовоспалительной активностью, биосовместимостью, биоразлагаемостью, способностью взаимодействовать с внешней поверхностью клеточной мембраны [141, 142].

### 1.5.3. Хитозан

Хитозан (ХТЗ) – это линейный основной полисахарид, состоящий из мономерных звеньев N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина, которые соединены гликозидными связями. ХТЗ получают методом щелочного (NaOH) деацетилирования хитина (рис. 18) [143]. Хитин в основном извлекают из экзоскелета морских ракообразных животных (креветки, крабы), но также возможно получение из насекомых, грибов и бактерий [144]. В зависимости от выбранного источника получения хитина и метода проведения синтеза, средний молекулярный вес хитозана может колебаться от 50 до 2000 кДа [145]. В продаже доступен ХТЗ со степенью деацетилирования (СД) 40 – 90 %.

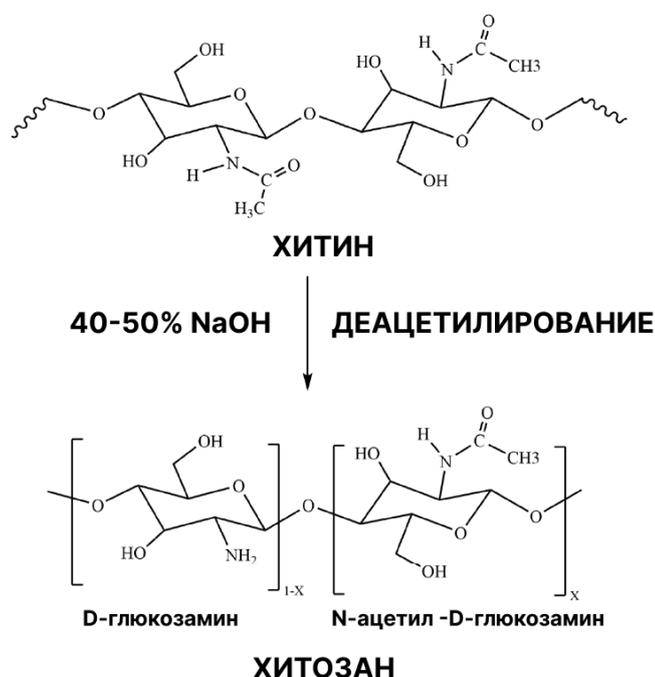


Рисунок 18. Процесс деацетилирования хитина в хитозан

Хитозан – аморфно-кристаллический полимер, который нерастворим в воде (нейтральный pH). В слабокислых условиях, в органических и неорганических кислотах (pH < 6) ХТЗ растворяется за счет протонирования аминогрупп молекул полимера [146, 147]. Кроме того, хитозан может быть растворен в концентрированной щелочи, в фторированных растворителях, а также в 1-бутил-

3-метилимидазолий ацетате [147, 148]. Существует множество важных факторов, оказывающих существенное влияние на растворимость хитозана [149].

Хитозан является жесткоцепным полимером, который в кислой среде ведет себя как полиэлектролит. Жесткость полимера характеризуется персистентной длиной цепи ХТЗ ( $l_p$ ), зависящей от ряда факторов – степени деацетилирования, ионной силы и рН раствора, расположения ацетильных групп в полимере, молекулярной массы хитозана. Вследствие этого величина  $l_p$  варьируется в широких пределах 6 – 25 нм [145, 150]. Степень деацетилирования молекул хитозана существенно влияет на конформацию полисахарида в слабокислой среде. Так, с увеличением СД цепь полисахарида становится более гибкой и может принять конформацию хаотического клубка [148, 151].

ХТЗ – это поликатионный полимер, который содержит одну группу  $-NH_2$  и две группы  $-OH$  на каждом глюкозаминном звене. Гидроксильные и аминогруппы в молекуле хитозана в слабокислых растворах склонны к образованию внутри- и межмолекулярных водородных связей между макромолекулами полисахарида, что приводит к образованию линейных агрегатов [152]. Однако протонированные аминогруппы ХТЗ являются реакционноспособными центрами, которые могут взаимодействовать с противоположно заряженными молекулами. Такое ионное взаимодействие между катионным хитозаном и анионными ПС, красителями может быть использовано как метод локальной доставки биологически активных анионных соединений, содержащих анионные группы [58, 153].

Физико-химические (растворимость, кристаллическая структура и жесткость полимера) и биологические свойства (биосовместимость, биоразлагаемость, низкая токсичность и антимикробная активность) хитозана зависят от многих факторов, включая степень деацетилирования и ММ полисахарида [154]. В работах [155, 156] показано, что хитозан со средней молекулярной массой (50 – 190 кДа) и высокой СД (>70 %) является сильным противомикробным средством.

Из хитозана изготавливают препараты различного медицинского назначения, в том числе для доставки лекарственных препаратов, тканевой

инженерии, БАДов для снижения уровня холестерина и сахара в крови [157]. Перевязочные материалы на основе хитозана применяются для лечения острых/хронических ран, потому что ХТЗ обладает мукоадгезивным и антибактериальным свойством [143, 158]. Основные формы повязок на основе ХТЗ – это пленки, губки и гидрогели [159, 160]. Известно достаточно большое количество хитозановых перевязочных материалов, такие как *Celox*, *Chitopack*, *Chitoflex*, *Tegasorb* [161, 162]. Данные повязки обладают ранозаживляющим действием, способствуют росту грануляционной ткани и регенерации дермы [162, 163].

### 1.6.2. Альгинат натрия

Альгинат натрия (АН) – это анионный гетерополисахарид и полиэлектролит природного происхождения, который является натриевой солью альгиновой кислоты [164]. АН относится к семейству линейных блок-сополимеров, состоит из мономерных звеньев D-маннуроносовой кислоты (М) и L-гулууроносовой кислоты (G), соединенных между собой (1-4) гликозидными связями (рис. 19). В молекуле альгината натрия образуются гомополимерные блочные конструкции на основе М (...MMMM...) и G-звеньев (...GGGG...), а также возможно строгое или хаотическое чередование гетерополимерных блоков данных уроновых кислот (...MGMGGM...) [165]. Физико-химические свойства АН (вязкость полимерного раствора, водопоглощающая способность, переход золь/гель), а также ММ полисахарида зависят от соотношения блоков маннуроновых и гулууроновых кислот [166]. Так, с увеличением содержания GG блоков в молекуле альгината натрия растворимость ПС в воде повышается [167]. Молекулярная масса коммерческого АН, которая является средним значением всех молекул, присутствующих в готовом продукте, варьируется от 33 000 до 800 000 г/моль [168].

Регулируя соотношения М и G звеньев в АН, можно получить материал с различными прочностными свойствами, а именно за гибкость цепи анионного полисахарида отвечают звенья маннуроносовой кислоты, за жесткость и

складчатость структуры биополимера – гулурановая кислота [169]. Соотношения G и M блоков и их порядок расположения в структуре альгина натрия зависят от природного источника получения альгината [170, 171]. Альгинат экстрагируют из бурых водорослей семейства ламинариевых и саргассовых, а также возможно выделение альгината из бактерий рода псевдоманады и азотобактеров [172]. Состав и строение АН определяют  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектроскопией, ВЭЖХ, ИК-спектроскопией, круговым дихроизмом [169, 170, 173].

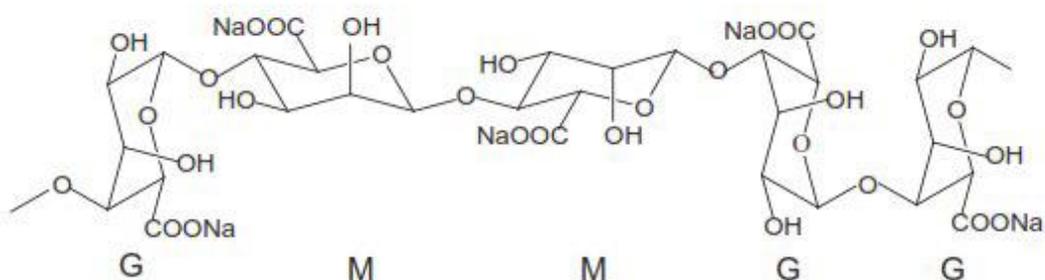


Рисунок 19. Химическая структура альгината натрия

Альгинат натрия медленно растворяется в воде при комнатной температуре с образованием устойчивого вязкого полимерного раствора. АН не растворим в спирте и водно-спиртовых растворах, в которых содержание спирта превышает 30 % по массе. Динамическая вязкость 1 % водного раствора АН составляет 20 – 400 мПа\*с при 20 °С. Растворимость анионного полисахарида зависит от рН растворителя (осаждение полимера при рН 3 – 3,5) и ионной силы [174]. Вязкость АН зависит от ММ полимера, но данный физико-химический параметр можно варьировать, изменяя концентрацию и температуру водного раствора альгината натрия, рН растворителя, а также добавляя двухвалентные ионы [168].

Альгинат натрия переходит в гелеобразное состояние в присутствии двухвалентных катионов, таких как  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , которые сшивают полисахаридные цепи по модели «яичного ящика» [175, 176]. Гели на основе АН нашли широкое применение в пищевой и фармацевтической промышленности, в косметологии, а также в регенеративной медицине [176, 177].

По своим биологическим свойствам альгинат натрия является нетоксичным, биосовместимым, биоадгезивным и гидрофильным полисахаридом [165, 168, 178]. Благодаря наличию таких свойств из альгината натрия создают перевязочные материалы для лечения язв, ожогов, кровоточащих и хирургических ран [178]. Раневые повязки на основе альгината выпускаются фармацевтическими компаниями в виде гидрогелей, пленок и губок, а именно в продаже доступны *Algicell, Guardix-SG, SeaSorb, Tromboguard* [179, 180]. По сравнению с обычными повязками для ран альгинатные повязки впитывают раневые жидкости, поддерживают физиологически влажную среду в ране и минимизируют бактериальные инфекции. Однако АН не проявляет антибактериальных свойств [178]. Для повышения применимости альгинатных повязок в медицинской практике при создании перевязочного материала на основе АН добавляют соединения, обладающие противомикробной активностью в отношении патогенов [181, 182].

### **1.7. Фотодинамическая инактивация патогенной микрофлоры с использованием антраценовых красителей в качестве фотосенсибилизаторов в присутствии АП и полисахаридов**

Как было сказано выше, красители оказались эффективны в фотодинамической инактивации (ФДИ или антимикробной ФДТ) патогенных клеточных культур. Однако антраценовые красители (также как порфириновые ФС), в том числе МС и БР, склонны к агрегации, что приводит к понижению их фотосенсибилизирующей активности, а, следовательно, к снижению эффективности ФДИ. Для повышения активности АК их иногда используют совместно с амфифильными полимерами или полисахаридами, способствующими их разагрегации.

Так, в работах [10, 183 – 185] показано, что амфифильные полимеры (плюроники, поливинилпирролидон), введенные в водные растворы порфириновых ФС, повышают фотодинамическую активность ФС, что приводит

к эффективному уничтожению микроорганизмов и быстрому заживлению поверхностных ран.

В работе [186] предложена система на основе БР-плюроник F127-карбопол для местного лечения вторичных раневых инфекций методом АФДТ. В *ex vivo* экспериментах (кожа свиньи, взятая с ушной области) было выявлено, что данная гелеобразная система удобна в применении, и бенгальский розовый способен преодолеть защитный барьер кожи и накапливаться в дерме. Кроме того, трехкомпонентная система БР-F127-карбопол обладает антимикробным фототоксичным эффектом в отношении золотистого стафилококка даже при низких концентрациях красителя.

Дополнительное ранозаживляющее воздействие, повышающее эффективность АФДТ с красителями, оказывает использование полисахаридов. В частности, в [13] показано, что фотосенсибилизирующая фурфурилальгинатная раневая повязка, содержащая 0,5 % БР и эпидермальный фактор роста, обладала ранозаживляющим эффектом при АФДТ, а именно обеспечивала практически полное заживление раны у лабораторных крыс на 14 сутки после операции. Также гистологические данные показали, что данная система не вызывала воспалительную реакцию в ране, а наблюдалось образование фибриновой матрицы и регенерация эпителия.

Кроме того, отмечено повышение эффективности фотодинамической инактивации патогенных клеточных культур при использовании антраценовых красителей совместно с амфифильными полимерами.

В частности, *J. C. M. Soares* и его коллегами была изучена эффективность систем на основе МС и МС-плюроник F127 при ФДИ биопленок *S. Mutans* и *C. Albicans* методом АФДТ [187]. Проведенные исследования показали, что после 5 – 30 мин темновой инкубации двухкомпонентной системы МС-F127 в микроорганизмах с последующим их облучением светом длиной волны 660 нм (доза облучения 15 Дж/см<sup>2</sup>, время облучения 16 мин) жизнеспособность биопленок *S. Mutans* и *C. Albicans* значительно уменьшилась по сравнению с аналогичным методом исследования, где использовался раствор чистого МС.

Причем с увеличением времени предоблучения фототоксическое действие препарата МС-F127 повышалось, что приводило к значительному сокращению бактериальной микробной популяции и полному уничтожению дрожжевой биопленки [187].

Показано, что МС совместно с наночастицами серебра (НЧ Ag) и ПВП обладает высокой антимикробной активностью при ФДИ в отношении золотистого стафилококка и кишечной палочки [188]. Так, фотодинамическая обработка в присутствии МС уменьшала выживаемость патогенов на 50 – 70 %, в то время как ФДИ в присутствии МС-НЧ Ag-ПВП приводила практически к полному уничтожению грамположительной и грамотрицательной микрофлоры (*S. aureus* и *E. Coli*).

Антибактериальная фотодинамическая обработка метиленовым синим и ПЭГ200 эффективно искореняет микробную флору, обитающую в корневых каналах зубов человека. Причем двухкомпонентная система оказывала фототоксическое действие лишь на биопленки *E. Faecalis* [189].

Как уже упоминалось, помимо амфифильных полимеров, повышать эффективность АФДТ при использовании красителей в роли ФС, могут полисахариды. В частности, в работах [53, 58] показано, что бенгальский розовый, конъюгированный хитозаном (БР-ХТЗ) более эффективно уничтожает биопленки грамположительных (*E. Faecalis*) и грамотрицательных бактерий (*P. Aeruginosa*) методом АФДТ, по сравнению с чистым БР и МС. Авторы считают, что высокая фотодинамическая активность БР-ХТЗ в отношении бактериальных пленок различной природы связана с тем, что катионный полисахарид хитозан выступает в качестве «доставщика» анионного ФС БР внутрь бактериальных клеток. Известно, что анионные ФС локализуются лишь на поверхности мембраны грамотрицательных бактериальных клеток [26]. Возможно также, что 100 % уничтожение биопленок на основе *P. Aeruginosa* и *E. Faecalis* БР-ХТЗ методом АФДТ связано с проявлением синергетического антибактериального эффекта такой двухкомпонентной системы, поскольку БР и хитозан обладают бактерицидными свойствами.

Помимо бенгальского розового систему метиленовый синий-хитозан применяли при АФДТ биопленок *S. aureus* и *P. Aeruginosa*, которые часто встречаются в хронических ранах [78]. При этом хитозан использовался в виде наночастиц. Авторами наблюдалось нарушение структуры биопленок различной природы и глубокое проникновение МС внутрь бактериальных пленок.

Следует также отметить, что взаимодействие красителей с амфифильными полимерами и полисахаридами приводит к изменениям ЭСП и спектров флуоресценции МС и БР [53, 58, 121, 189 – 192].

*Таким образом, антимикробная фотодинамическая терапия является эффективным методом лечения локальных инфекционных воспалительных процессов, вызванных, в том числе, антибиотикорезистентными микроорганизмами. В качестве фотосенсибилизаторов при АФДТ в настоящее время используют соединения порфириновой природы (замещенные бактериохлорины, корролы, катионные хлорины) и красители с фотосенсибилизирующими свойствами, в том числе антраценовые красители (метиленовый синий, бенгальский розовый). Для повышения активности красителей, характерной чертой которых является способность к образованию агрегатов в водных растворах, их в ряде случаев используют вместе с амфифильными полимерами или полисахаридами, которые способствуют агрегации АК. Однако для создания наиболее эффективной системы АК-АП, АК-ПС или АК-АП-ПС для красителей разной структуры необходимо установление механизма взаимодействия красителя с амфифильным полимером и полисахаридом. Это возможно лишь при проведении экспериментов в модельных условиях по выявлению влияния АП и ПС на фотогенерацию антраценовым красителем активных форм кислорода (прежде всего синглетного  $^1\text{O}_2$  кислорода). Решению этой проблемы и посвящена данная работа. Проведены исследования влияния амфифильных полимеров разной химической структуры и полисахаридов на фотосенсибилизирующую активность бенгальского розового и метиленового синего, для каждого из красителей установлен механизм*

*взаимодействия АК-АП и определены полимеры, повышающие их активность в наибольшей степени. Полученные результаты подтверждены при проведении экспериментов in vivo.*

## 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 20.

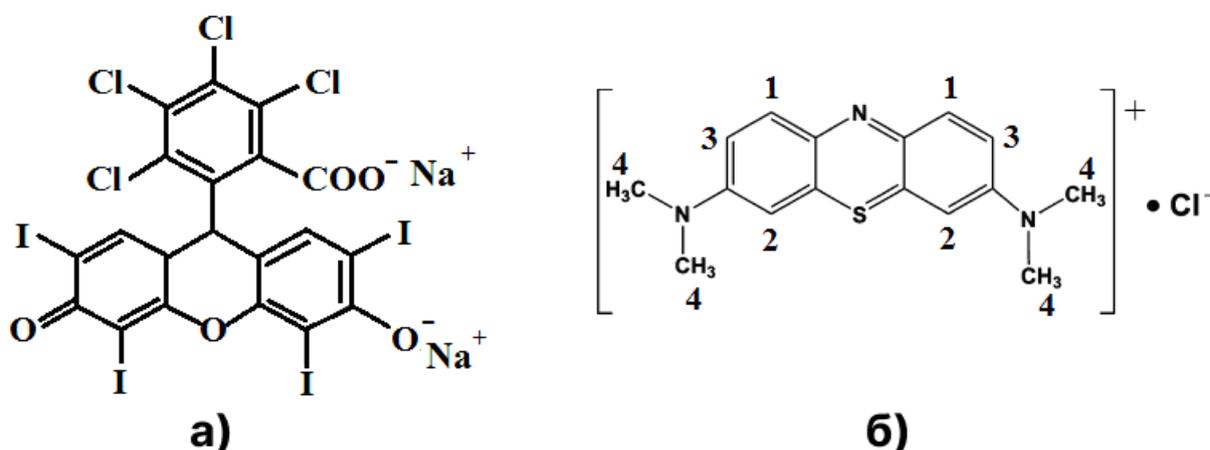


Рисунок 20. Химические структуры красителей бенгальского розового (а) и метиленового синего (б)

В качестве АП были взяты тройные блок-сополимеры (А-В-А типа), плуроники 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). Для плуроника F127 соотношение полиэтиленоксидной (ПЭО) /полипропиленоксидной (ППО) части полимера составляет 3,1:1  $[ККМ_{F127}] = 2,8 \times 10^{-6}$  М, для плуроника F108 соотношение ПЭО/ППО части – 5,3:1  $[ККМ_{F108}] = 2,2 \times 10^{-5}$  М [93, 97, 99]. 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). Структурные формулы АП и полисахаридов представлены на рисунке 21.

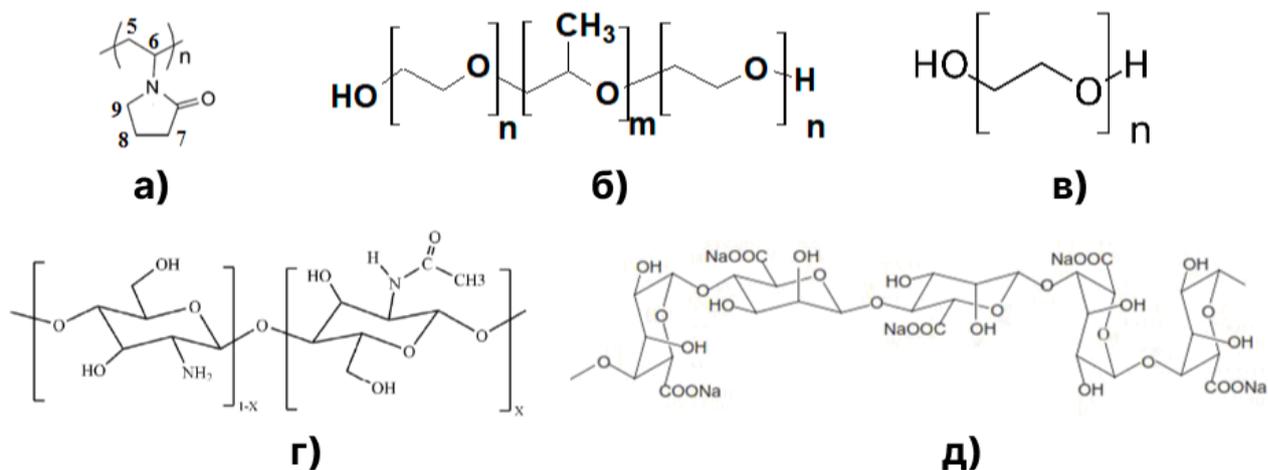


Рисунок 21. Структурные формулы АП: поли-N-винилпирролидона (а), плуроника F108 ( $n = 265$  и  $m = 50$ ) и F127 ( $n = 200$  и  $m = 65$ ) (б), полиэтиленгликоля (в) и полисахаридов хитозана (г) и альгината натрия (д)

## 2.2. Получение фотосенсибилизирующих систем на основе АК-АП, АК-ПС и АК-АП-ПС

Для приготовления реакционной системы антраценовые красители, АП и альгинат натрия растворяли в воде, хитозан растворен в 2 %-ной уксусной кислоте. При изучении фотосенсибилизирующих свойств БР и систем БР-ХТЗ, БР-УК, БР-АП-ХТЗ бенгальский розовый и амфифильные полимеры растворяли в фосфатно-буферном растворе (PBS) ( $\text{pH } 7,2 - 7,6$ , 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  $2 \times 10^{-6}$  до  $1 \times 10^{-5}$  М, концентрация МС – от  $2,5 \times 10^{-6}$  до  $1 \times 10^{-5}$  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-УК рН = 4 – 3,6, а 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  $1 \times 10^{-4}$  М. В системах МС в отсутствии и присутствии полимеров концентрация ТРП =  $1,5 \times 10^{-5}$  М, и была взята во избежание зашкаливания сигнала флуоресценции ( $I_{\max} = 1000$  отн. ед.) (рис. 22).

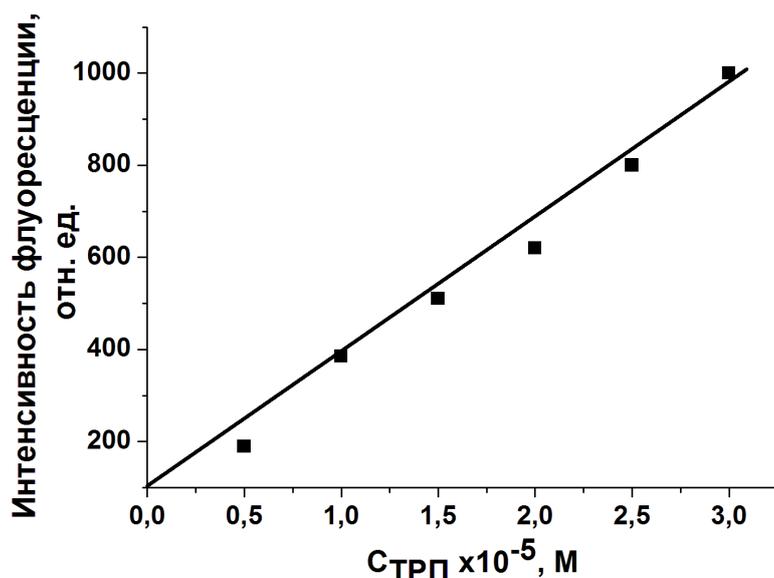


Рисунок 22. Зависимость интенсивности флуоресценции ТРП от концентрации субстрата

Далее полученные образцы перемешивали на магнитной мешалке («Heidolph», скорость перемешивания 250 об/мин, Германия) в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем осуществляли реакцию фотоокисления ТРП кислородом воздуха в кварцевой кювете ( $V = 3$  мл, толщина  $l = 10$  мм). Освещение проводили 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, продолжая перемешивание на магнитной мешалке исследуемых систем. 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 триптофана (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 ПС использовали эффективную константу  $k_{\text{эфф}}$  скорости фотоокисления триптофана, которую определяли по линейному участку кинетической кривой (рис. 23) в начальные моменты времени и 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 концентрации 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 %.

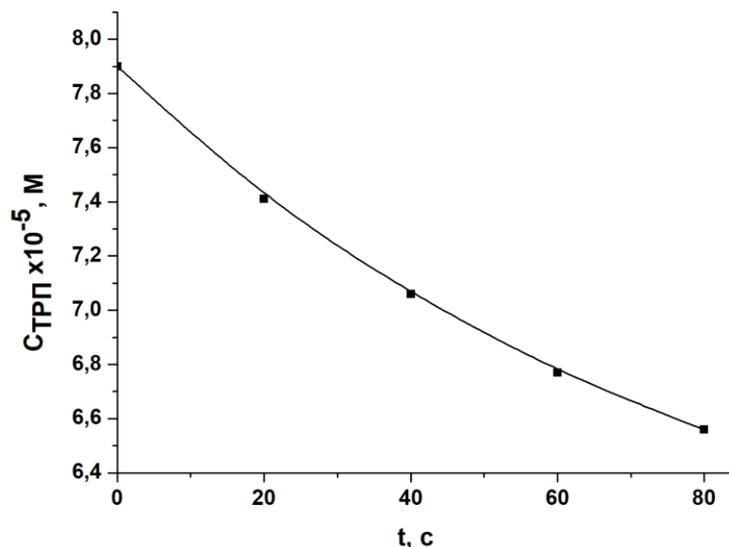


Рисунок 23. Кинетическая кривая окисления триптофана в присутствии бенгальского розового ( $5 \times 10^{-6}$  M)

### 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 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.

- *<sup>1</sup>H-ЯМР спектроскопия*

Спектры <sup>1</sup>H-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 D<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, 99 ат. % D) и помещали в стандартные стеклянные ампулы (внешний диаметр 5 мм). Спектры <sup>1</sup>H 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 (H<sub>2</sub>O, δ<sub>H</sub> = 4,80 м.д.).

Измерения <sup>1</sup>H-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*) исходных красителей (БР, МС), а также двух- (БР-АП, МС-АП, БР-ХТЗ, МС-АН) и трехкомпонентных систем (БР-АП-ХТЗ, МС-АП-АН) автоматически рассчитывалась спектрофлуориметром *Cary Eclipse* (Varian, Австралия) по значениям *G*, *I<sub>VV</sub>* и *I<sub>VH</sub>* 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<sub>VV</sub>* — интенсивность флуоресценции при вертикальной поляризации возбуждения и регистрируемого сигнала, *I<sub>VH</sub>* — интенсивность флуоресценции при вертикальной поляризации возбуждения и горизонтальной поляризации регистрируемого сигнала.

Для определения *r* исследуемые растворы возбуждались светом с длиной волны λ<sub>возб. БР</sub> = 555 нм и λ<sub>возб. МС</sub> = 665 нм. Анизотропию реакционных смесей регистрировали при длине волны λ<sub>БР</sub> = 585 нм и λ<sub>МС</sub> = 685 нм. Ошибка измерений составляла не более 3 %, число измерений одного образца – 8 – 10 раз.

### 2.3.2. Динамическое рассеяние света

Размер частиц исходного бенгальского розового, плуроника F108 и ПВП в водном растворе и систем БР-АП определяли методом динамического рассеяния света на анализаторе Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания), оснащённом гелий-неоновым лазером мощностью 4 мВт и с длиной волны 633 нм. Концентрация БР, плуроника F108 и поливинилпирролидона составляла  $1 \times 10^{-3}$  М, системы БР-АП были взяты в соотношении 1:1 по молям. Измерения исследуемых образцов проводили при комнатной температуре и угле рассеяния  $173^\circ$ . Обеспыливание растворов проводили путем фильтрации через поливинилиденфторидные (PVDF) фильтрующие насадки с диаметром пор 0,22 мкм (Milipore Millex-GV, Германия) в кварцевую кювету PSC1115  $V = 3$  мл. Данные обрабатывались с помощью программного обеспечения Zetasizer Software 6.20 (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Измерения размера частиц исследуемых образцов проводили в центре коллективного пользования «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН на базе лаборатории физико-химической модификации биополимеров под руководством к.х.н. Плащиной И. Г. и к.х.н. Дубовика А. С.

Методом динамического рассеяния света определены величины гидродинамических диаметров частиц МС и двухкомпонентных систем МС-АП (1 : 1 по молям) в воде на анализаторе Photocor Complex (ООО «Фотокор», Россия). Измеритель оснащён лазерным источником света с длиной волны 450 нм и мощностью 65 мВт. Исследуемые растворы обеспыливали путем фильтрования через нейлоновые мембраны с диаметром пор 200 нм (Milipore Millex-HN, Германия). Измерения проводились при  $t = 20^\circ\text{C}$ , с заданным углом рассеяния света  $90^\circ$ . Полученные данные обрабатывались в программе DynaLS. Измерения проводили при одной и той же концентрации полимеров и МС –  $2 \times 10^{-3}$  М. Измерения размера частиц исследуемых образцов проводили в центре коллективного пользования ФИЦ ХФ РАН под руководством н.с. Каплина В. С.

### 2.3.3. Атомно-силовая микроскопия

Методом атомно-силовой микроскопии были изучены структурные особенности поверхности исходных красителей (БР и МС), полимеров (F108, ХТЗ) и их смесей (БР-F108, БР-F108-ХТЗ, МС-АН и МС-АН-F108). Образцы представляли собой поликристаллические порошки (красители) или тонкие пленки (полимеры, их смеси с красителями). Образцы получали путем испарения водных растворов исследуемых компонентов на слюдяной подложке при комнатной температуре в беспылевом шкафу в течение недели. Концентрация АК в однокомпонентном растворе составляла  $1 \times 10^{-3}$  М и  $5 \times 10^{-5}$  М (БР и МС соответственно). В растворе, содержащем АК и полимеры, концентрация АК составляла  $5 \times 10^{-6}$  М и  $2,5 \times 10^{-6}$  М (БР и МС соответственно). Концентрация полимеров: [F108] = 0,073 % масс., [ХТЗ и АН] = 0,005 % масс. Для каждой системы было получено 5 образцов в одинаковых условиях 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 HA-NC” с жесткостью 3,5 – 12,0 Н/м и резонансной частотой 140 – 235 кГц (радиус закругления 10 нм). Размеры изображения –  $10 \times 10$  мкм и  $3 \times 3$  мкм при частоте сканирования 1 Гц с разрешением  $512 \times 512$  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 [62], что приводит к понижению активности АК, а следовательно, и к снижению эффективности метода АФДТ.

Для создания 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 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 фотосенсибилизаторов в модельных процессах фотоокисления. Это также было показано в *in vitro* и *in vivo* экспериментах [9, 185, 193, 194].

#### 3.1. Фотосенсибилизирующая активность БР в воде и PBS

На рисунке 24 представлена зависимость эффективной константы скорости ( $k_{эфф}$ ) реакции фотоокисления триптофана от концентрации БР. Видно, что с увеличением концентрации бенгальского розового величина  $k_{эфф}$  падает. Вероятнее всего это связано с тем, что с увеличением содержания бенгальского розового в водном и PBS растворе увеличивается содержание агрегированных димерных форм антраценового красителя.

Кривые 1 и 2 на рисунке 24 практически совпадают. Это очевидно свидетельствует о том, что характер агрегации БР не зависит от состава и концентрации солевого буферного раствора. Дальнейшие исследования

спектральных свойств бенгальского розового проводились в воде и буферном растворе.

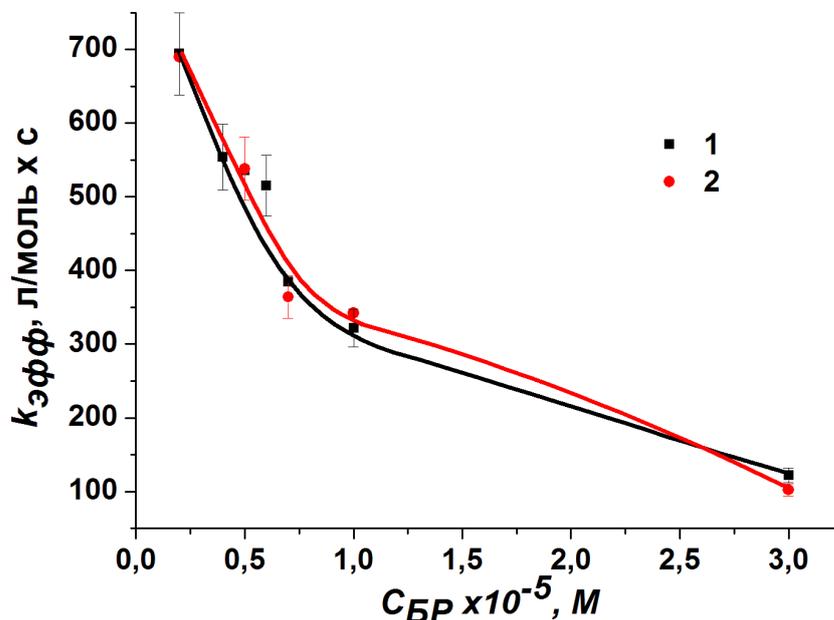


Рисунок 24. Зависимости эффективной константы скорости ( $k_{эфф}$ ) реакции фотоокисления триптофана ( $1 \times 10^{-4} M$ ) от концентрации бенгальского розового в воде (1) и PBS (2)

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

Процесс агрегации бенгальского розового фиксируется в его ЭСП и спектрах флуоресценции (рис. 25, а и б).

Как уже упоминалось в литературном обзоре, в спектре поглощения БР присутствует основная полоса с максимумом при  $\lambda = 550$  нм, ассиметричная интенсивная ( $\epsilon = 1 \times 10^5 M^{-1} \cdot см^{-1}$ ), которая относится к мономерной форме АК, и небольшое «плечо» в области  $\lambda = 515 - 520$  нм, относящееся к димерной форме БР (рис. 25 а) [56, 61, 62].

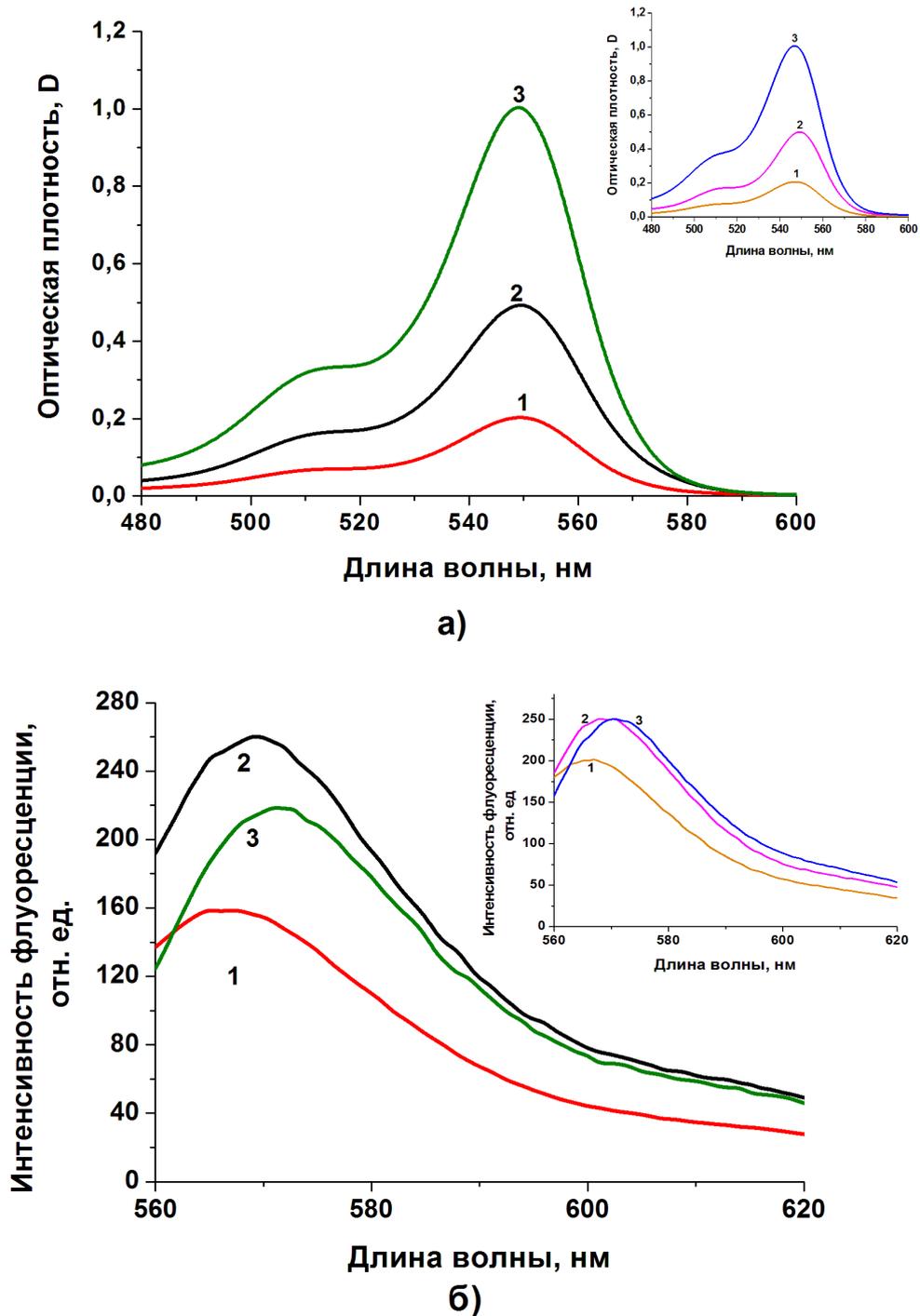


Рисунок 25. Электронные спектры поглощения (а) и спектры флуоресценции (б) БР в воде при концентрациях:  $2 \times 10^{-6}$  М (1),  $5 \times 10^{-6}$  М (2) и  $1 \times 10^{-5}$  М (3).

Врезка – ЭСП (а) и спектры флуоресценции (б) БР в PBS при концентрациях  $2 \times 10^{-6}$  М (1),  $5 \times 10^{-6}$  М (2) и  $1 \times 10^{-5}$  М (3)

Как видно из рисунка 25 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  $2 \times 10^{-6}$  М до  $1 \times 10^{-5}$  М в воде наблюдается экстремальный рост интенсивности флуоресценции, обусловленный тушением при концентрациях БР  $> 5 \times 10^{-5}$  М, и небольшой батохромный сдвиг полосы флуоресценции красителя (рис. 25 б), что подтверждает образование димеров и более крупных ассоциатов молекул флуорофора. В спектре флуоресценции БР в PBS (рис. 25 б, врезка) с увеличением концентрации АК наблюдаются рост интенсивности флуоресценции с запределиванием при концентрации БР  $> 5 \times 10^{-5}$  М и небольшой батохромный сдвиг полосы флуоресценции бенгальского розового ( $\lambda = 572$  нм), что очевидно свидетельствует о более медленном процессе агрегатообразования с ростом концентрации БР в фосфатно-буферном растворе.

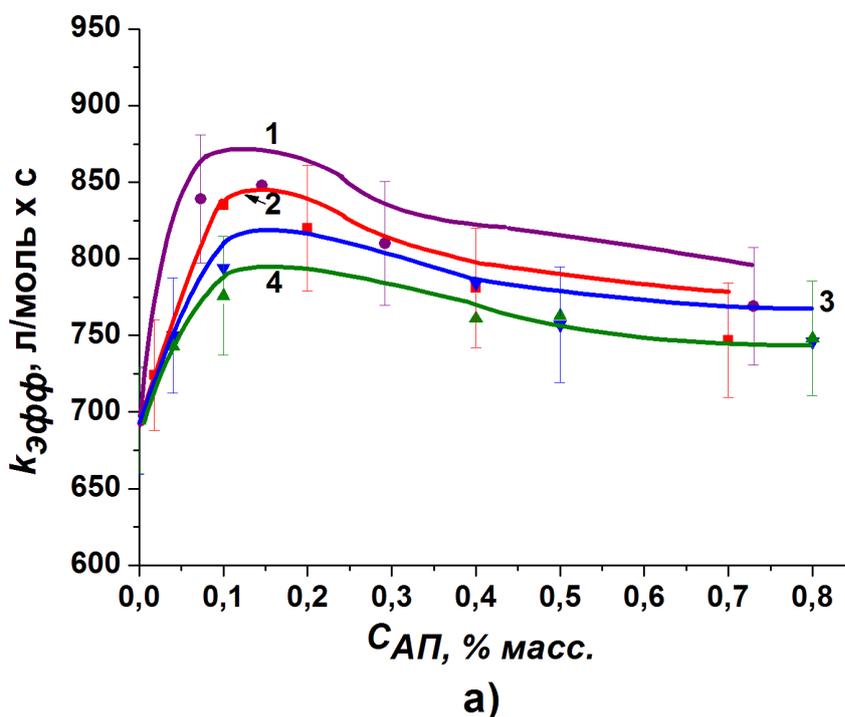
### 3.2. Особенности фотокаталитической активности систем БР-АП

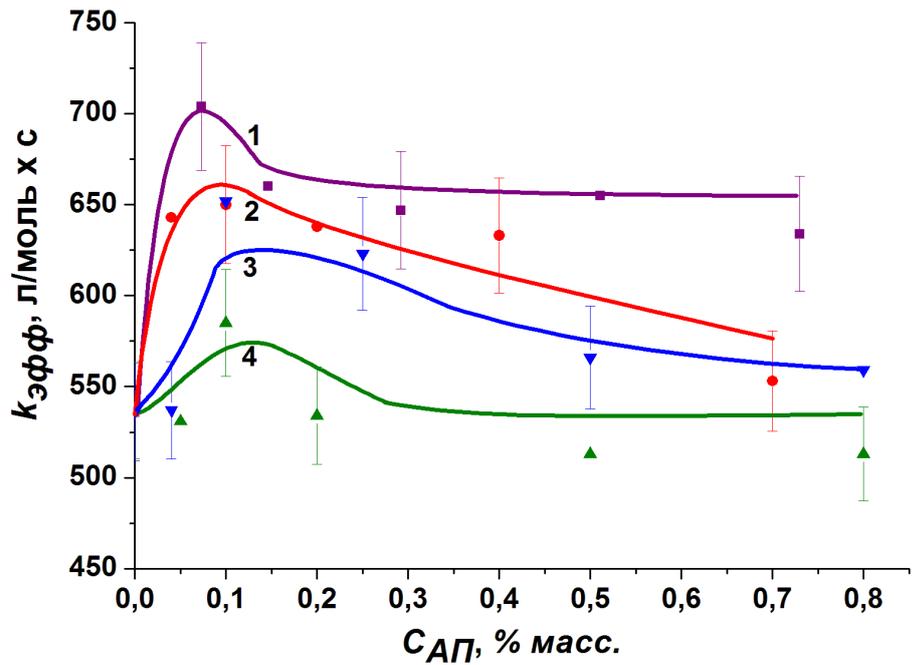
Как уже упоминалось выше, в присутствии АП (ПВП, ПЭГ, плуроников) наблюдается рост фотокаталитической активности порфириновых ФС – димегина, фотодитазина и других ФС в реакции фотоокисления триптофана, что связано с образованием слабосвязанных нестехиометрических комплексов ФС-АП и разагрегацией молекул ФС [9, 195].

На рисунке 26 приведены зависимости эффективной константы скорости ( $k_{эфф}$ ) реакции фотоокисления ТРП в присутствии БР в воде при концентрациях красителя  $2 \times 10^{-6}$  М (а),  $5 \times 10^{-6}$  М (б) и  $1 \times 10^{-5}$  М (в) от концентрации АП. Видно, что величина  $k_{эфф}$  в присутствии АП возрастает на 20 – 30 % при концентрациях БР  $2 \times 10^{-6}$  М и  $5 \times 10^{-6}$  М в воде (рис. 26, а и б соответственно). Причем наибольшее влияние на фотосенсибилизирующую активность БР (при его концентрациях  $2 \times 10^{-6}$  М и  $5 \times 10^{-6}$  М) оказывают плуроник F108 (кривая 1), F127 (кривая 2) и ПЭГ (кривая 3) с концентрацией АП 0,1 % масс. (рис. 26, а и б). Дальнейшее повышение концентрации АП понижает величину  $k_{эфф}$ , что, вероятнее всего, происходит из-за «неэффективного» связывания красителя и ТРП при увеличении содержания молекул полимеров в реакционном растворе. Другими словами, БР и

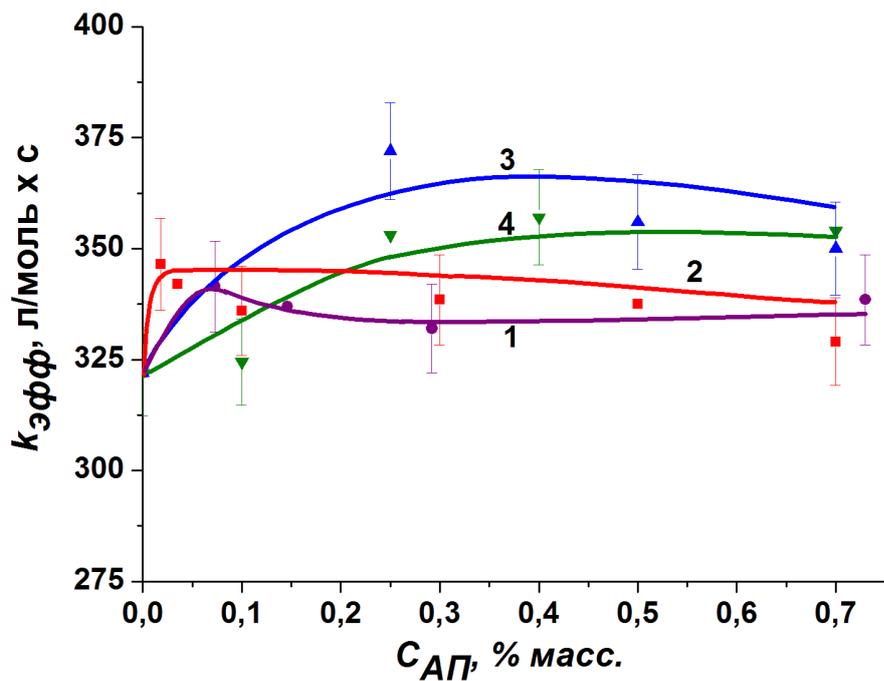
триптофан могут локализоваться на удаленных друг от друга участках полимерных цепей или могут связываться с разными макромолекулами амфифильных полимеров в реакционной среде. ПВП практически не оказывает влияния на фотокаталитическую активность БР (рис. 26, а – в, кривая 4). Возможно, это связано с тем, что ПВП в воде имеет конформацию макромолекулярного клубка. Скорее всего, и краситель, и ТРП находятся на разных участках макромолекул ПВП, что, вследствие малого времени жизни синглетного кислорода в водных средах, ведет к снижению  $k_{эфф}$ .

На рисунке 26 отражено, что фотокаталитическая активность  $[BR] = 1 \times 10^{-5} M$  в присутствии АП незначительно растет. Вероятнее всего при высокой концентрации БР его взаимодействия с АП недостаточно для его эффективной агрегации.





б)



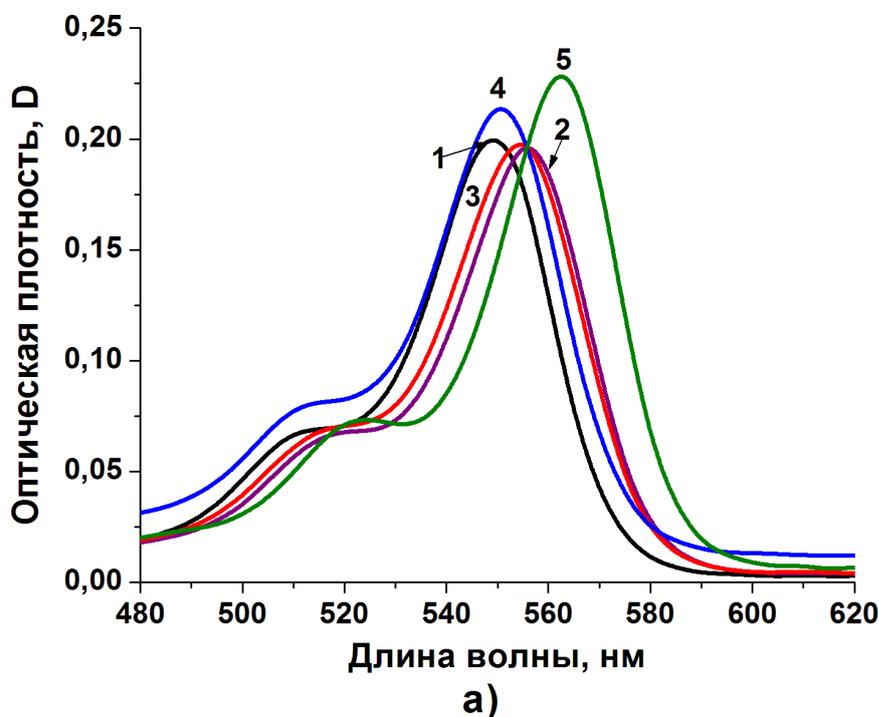
в)

Рисунок 26. Зависимости эффективной константы скорости ( $k_{эфф}$ ) реакции фотоокисления триптофана ( $1 \times 10^{-4}$  М) в присутствии БР в воде ( $2 \times 10^{-6}$  М (а),  $5 \times 10^{-6}$  М (б) и  $1 \times 10^{-5}$  М (в)) от концентрации АП: плуроник F108 (1), плуроник F127 (2), ПЭГ (3) и ПВП (4)

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

В ЭСП двойных систем БР-АП<sup>1</sup> наблюдаются батохромный сдвиг на 5 – 15 нм обеих полос поглощения БР ( $\lambda = 550$  и  $515$  нм соответственно), и рост оптической плотности основной (относящейся к мономерным формам БР) полосы поглощения красителя при длине волны  $550$  нм (рис. 27 а).

Кроме того, при добавлении АП в водный раствор БР наблюдается рост интенсивности полосы флуоресценции красителя в 2 – 5 раз (рис. 27 б). Наблюдаемые изменения в ЭСП и спектрах флуоресценции БР в присутствии АП свидетельствуют о том, что АП взаимодействуют с БР, что приводит к процессу агрегации молекул красителя. При этом наибольшее влияние и на ЭСП, и на спектр флуоресценции бенгальского розового оказывает ПВП (рис. 27, а и б, кривая 5). Это говорит о достаточно сильном гидрофобном взаимодействии между БР и ПВП, что, возможно, связано с наличием в структуре полимера и красителя выраженных гидрофобных фрагментов [110, 121, 196].



<sup>1</sup> Характер изменений ЭСП и спектр флуоресценции БР в присутствии АП одинаков при концентрациях красителя  $5 \times 10^{-6}$  М и  $1 \times 10^{-5}$  М, [АП]=0,1 % масс.

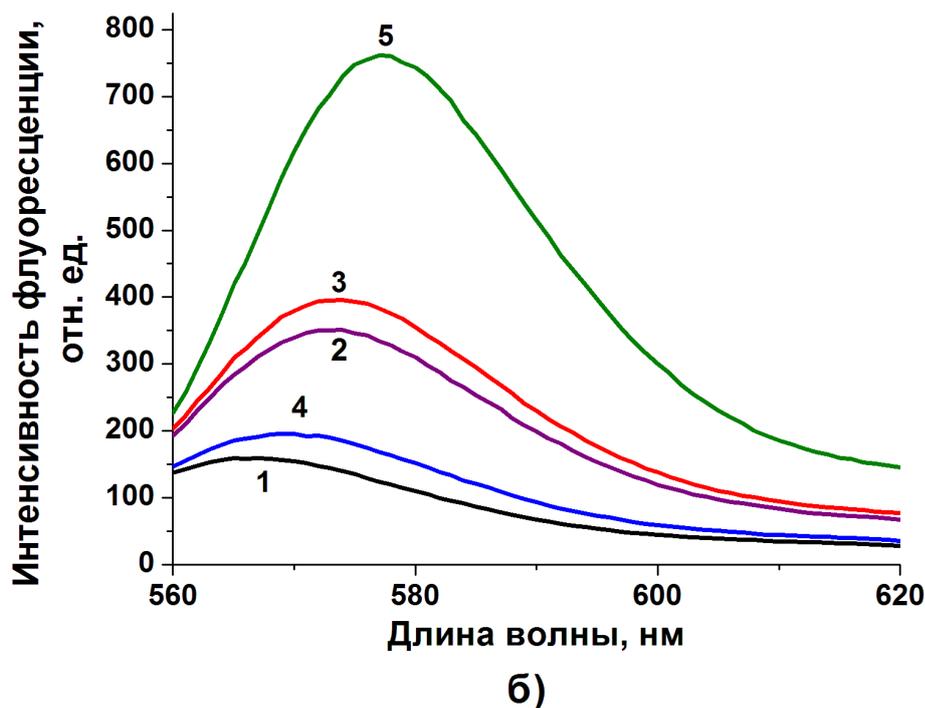


Рисунок 27. а) – ЭСП и б) – спектры флуоресценции БР (1) и систем БР-АП. В качестве АП взяты плюроники F108 (2), F127 (3), ПЭГ (4) и ПВП (5).  $[BR] = 2 \times 10^{-6}$  М, концентрации полимеров – 0,1 % масс.

На рисунке 28 представлены зависимости интенсивности флуоресценции ( $I$ ) бенгальского розового ( $C = 2 \times 10^{-6}$  М) от концентрации АП<sup>1</sup>. Как следовало из спектров флуоресценции, приведенных на рис. 27 б, в присутствии АП наблюдается рост величины  $I$  красителя, причем наибольший рост интенсивности флуоресценции БР наблюдался в присутствии ПВП. Как видно из рисунка 28, уже при низкой ( $\sim 0,04$  % масс.) концентрации ПВП в растворе интенсивность флуоресценции БР увеличивается в  $\sim 4,5$  раза (рис. 28, кривая 4), достигая своего максимального значения по сравнению с величиной  $I$  чистого БР ( $I = 200$  отн. ед.).

В то же время максимальный рост  $I$  БР в присутствии плюроники наблюдается при концентрациях полимера  $\sim 0,7$  %, т.е. более чем в 20 раз превышающих содержание ПВП (рис. 28, кривые 1, 2). При этом величина

<sup>1</sup>Для систем БР–АП при концентрациях красителя  $5 \times 10^{-6}$  М и  $1 \times 10^{-5}$  М были получены аналогичные зависимости  $I$  от концентрации АП.

эффекта в присутствии плуроников существенно меньше. Наименьшее влияние на  $I$  закономерно оказывает ПЭГ (рис. 28, кривая 3) – наиболее гидрофильный из использованных АП. Приведенные данные говорят о наибольшей эффективности связывания БР с ПВП по сравнению с другими АП. Однако, как следует из вышеприведенных данных (рис. 26, а – в), слишком прочное связывание красителя с полимером очевидно препятствует росту скорости фотоокисления триптофана.

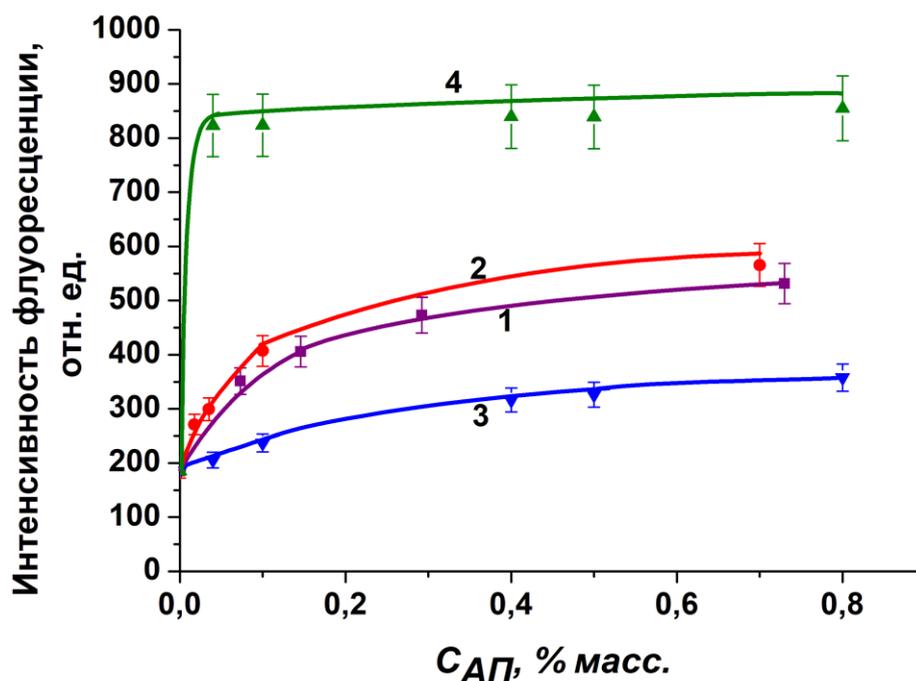


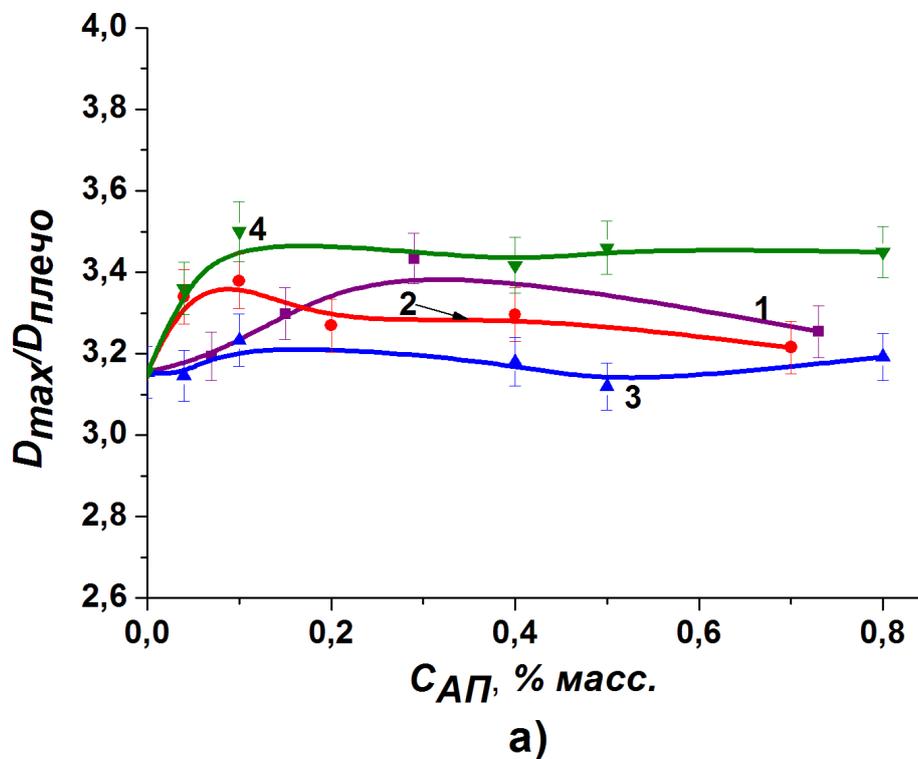
Рисунок 28. Зависимости интенсивности флуоресценции ( $I$ ) БР ( $2 \times 10^{-6}$  М) от концентрации АП: плуроник F108 (1), плуроник F127 (2), ПЭГ (3), ПВП (4)

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

Разагрегирование надмолекулярных образований БР в присутствии АП подтверждается изменением содержания димерных и мономерных форм БР в воде, которое можно определить по соотношению  $\varphi$  оптических плотностей полос с  $\lambda = 550$  и  $515$  нм ( $\varphi = D_{max}/D_{плечо}$ ), в присутствии АП. На рисунке 29 представлены зависимости  $D_{max}/D_{плечо}$  при  $[BR] = 2 \times 10^{-6}$  М (а),  $5 \times 10^{-6}$  М (б) и  $1 \times 10^{-5}$  М (в) от концентрации АП. Величина  $\varphi$  исходного БР при трех его различных

концентрациях составляет  $\sim 3,1$ , что согласуется с литературными данными [61, 197]. 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  $\varphi$  остается практически неизменной при дальнейшем увеличении содержания полимеров в системе БР-АП, что свидетельствует о сохранении определенного количества димерных форм и равновесия «мономер $\leftrightarrow$ димер» даже в присутствии избытка АП.

Данные рисунка 29 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 (рис. 29 а – в, кривая 4), особенно при концентрации БР  $5 \times 10^{-6}$  М.



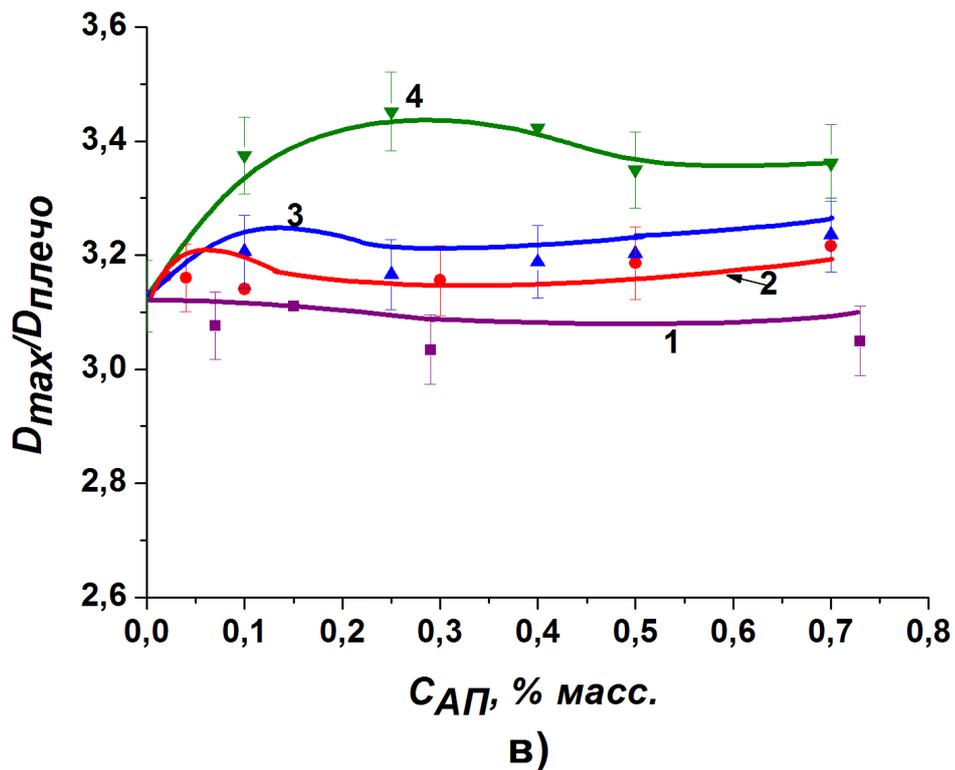
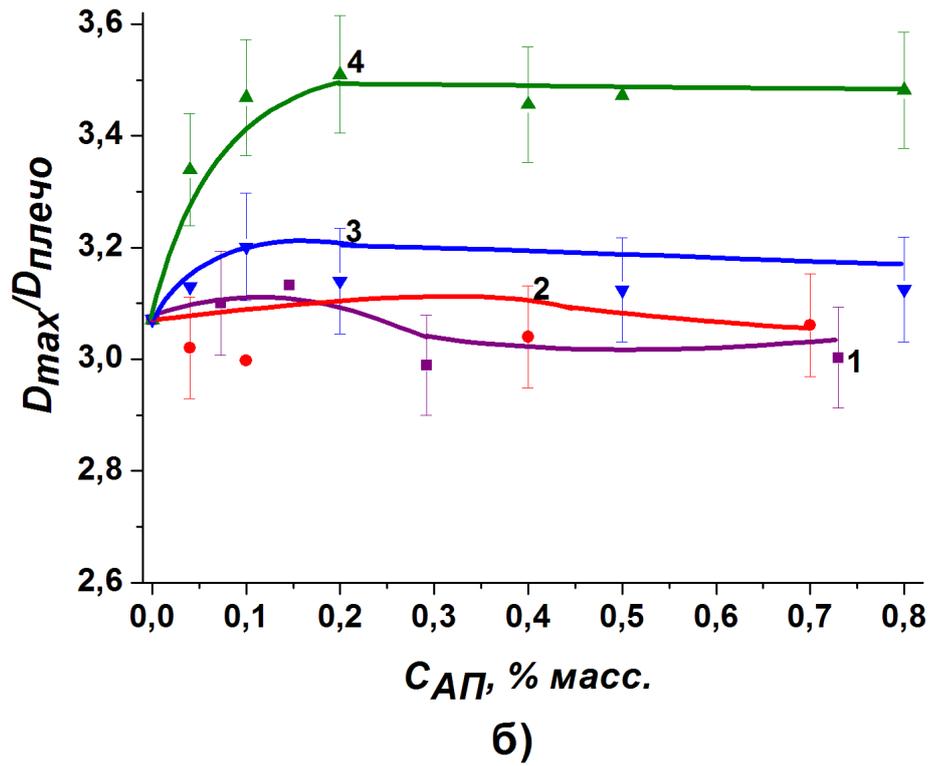


Рисунок 29. Зависимости  $\varphi = D_{\max}/D_{\text{плечо}}$  при  $[BR] = 2 \times 10^{-6}$  М (а),  $5 \times 10^{-6}$  М (б) и  $1 \times 10^{-5}$  М (в) от концентрации АП: плюроники F108 (1) и F127 (2), ПЭГ (3), ПВП (4)

### 3.3. Исследование системы БР-ПВП методом $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY (спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера и обмена)

Наличие взаимодействия между БР и ПВП обнаруживается также при исследовании ЯМР спектров этих систем. На рисунке 30 представлен двумерный спектр ЯМР  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY (Nuclear Overhauser Exchange Spectroscopy – спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера и обмена) дейтерированного водного раствора БР и ПВП (в соотношении массовых концентраций 1:1). По осям отложены протонные спектры данной двухкомпонентной системы. Двумерный спектр симметричен относительно диагонали (тонкая черная прямая на спектре). Диагональ – протонный спектр. Корреляционные сигналы вне диагонали в спектре – результат эффекта Оверхаузера и/или химического обмена. Химический обмен между ароматическими протонами БР (около 7,7 м. д.) и протонами полимера ПВП маловероятен. Поэтому сигналы в выделенной области на рисунке 30 (эффект Оверхаузера) несут информацию о межмолекулярном взаимодействии (перекрывании электронных облаков) протонов БР и ПВП, которое возможно за счет их пространственно близкого расположения. Вероятнее всего, формируются стековые структуры. На спектрах  $^1\text{H}$  для сигналов ПВП, помимо уширения в присутствии БР, наблюдается небольшое смещение в сторону сильных полей на 0,2 м. д., что характерно для случая, когда происходит частичное экранирование протонов ПВП системой ароматических колец молекул БР в стеке.

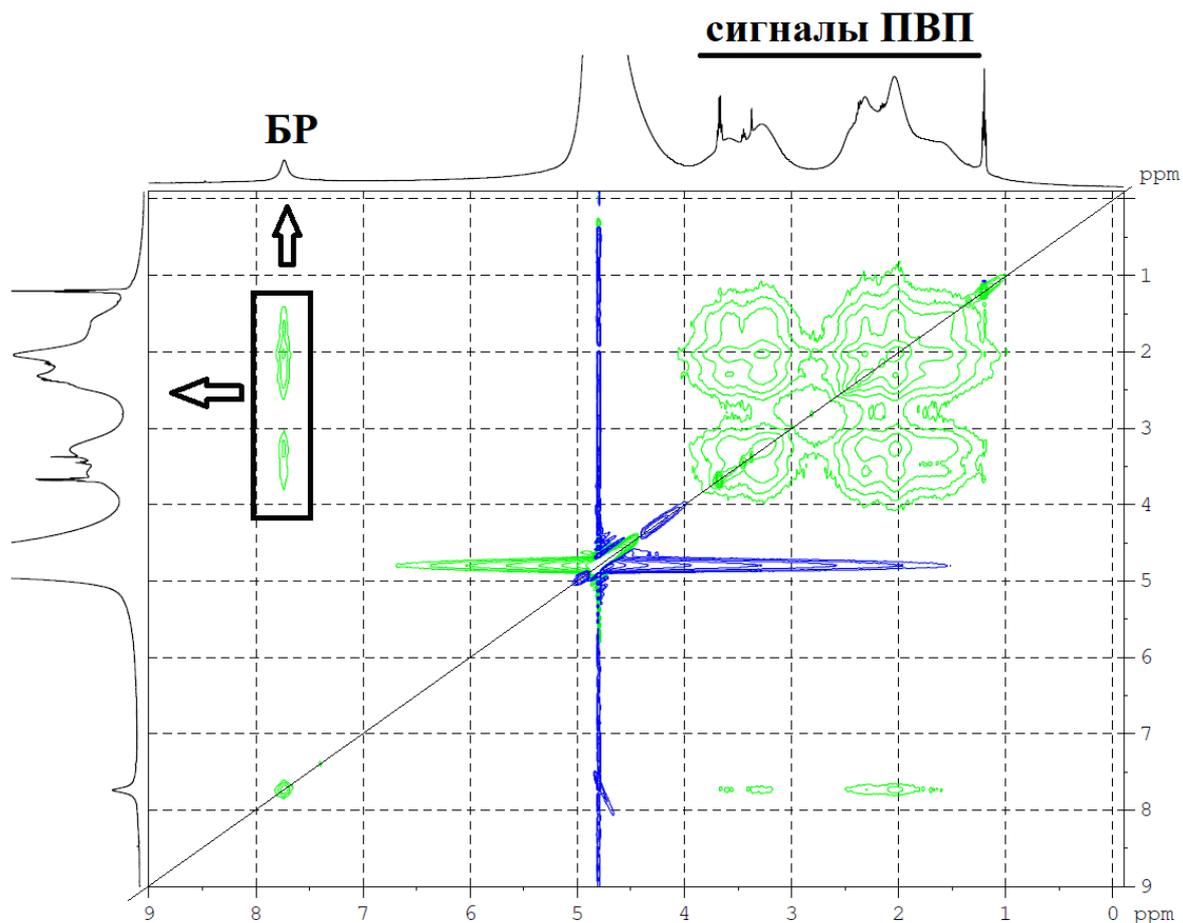


Рисунок 30. Двумерный спектр ЯМР  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY системы БР-ПВП (соотношение 1:1) в дейтерированной воде

### 3.4. Определение размера частиц БР, АП и систем БР-АП в воде методом ДРС

Для подтверждения возможного взаимодействия бенгальского розового с АП определен размер частиц исходного красителя, полимеров и систем БР-АП методом динамического рассеяния света (ДРС) (таблица 4). Для систем БР-АП были выбраны полимеры плюроник F108 и ПВП, которые, как следует из вышеприведенных данных, оказывают наибольшее влияние и на фотосенсибилизирующую активность (плюроник F108, рис. 26 а, б, кривая 1) красителя, и на его спектральные свойства (ПВП, рис. 27 а, б, кривая 5) [198].

Данные таблицы 4 показывают, что размеры частиц исходного БР в воде (при его концентрации  $1 \times 10^{-3}$  М) составляют  $\sim 0,7$  нм, что примерно соответствует индивидуальному размеру молекул бенгальского розового, и

~ 161 нм, что можно отнести к крупным агрегатам красителя. 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.

**Таблица 4.** Средний размер частиц БР, F108, ПВП и систем БР-АП в водных растворах, определенный методом динамического рассеяния света

Образец	Размер частиц, нм
БР	$0,7 \pm 0,2$
	$161,3 \pm 1,5$
F108	$5,2 \pm 0,2$
	$78,1 \pm 0,3$
ПВП	$6,05 \pm 0,5$
	$29,7 \pm 1,5$
БР+F108	$5,75 \pm 0,5$
	$35,2 \pm 1,5$
	$132,6 \pm 2,5$
БР+ПВП	$5,1 \pm 0,2$
	$15,4 \pm 0,4$
	$108,5 \pm 2,5$

где  $[BR] = 1 \times 10^{-3}$  М,  $[F108 \text{ и } ПВП] = 1 \times 10^{-3}$  М;

для систем БР-АП соотношение 1:1 по молям

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

## ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ АМФИФИЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ НА ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В РЕАКЦИИ ФОТООКИСЛЕНИЯ ТРИПТОФАНА

Как уже было отмечено в литературном обзоре, метиленовый синий также, как и анионный краситель бенгальский розовый, склонен в воде к самоорганизации с образованием димеров и более крупных агломератов, что проявляется в виде изменений фотосенсибилизирующих и спектральных свойств МС [87].

### 4.1. Фотокаталитическая активность метиленового синего в воде

На рисунке 31 представлена зависимость эффективной константы скорости  $k_{эфф}$  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.

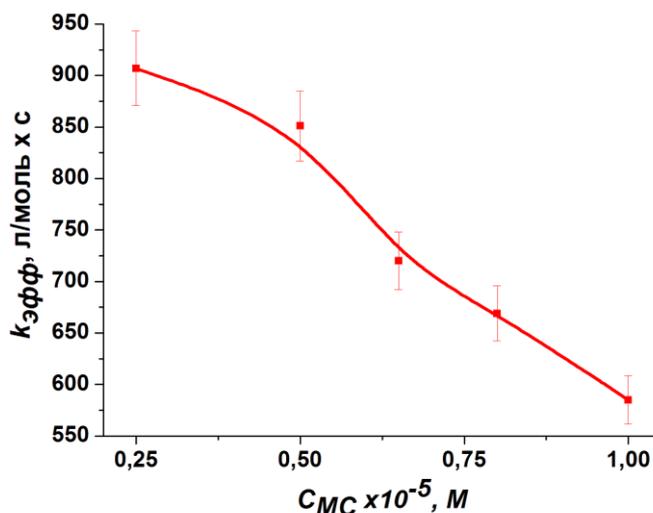
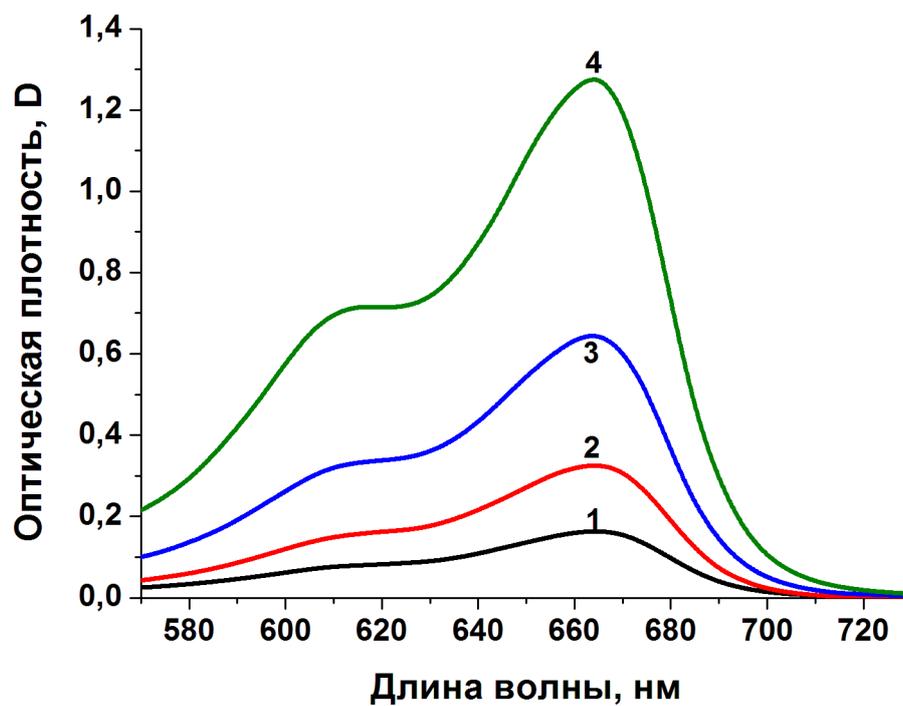


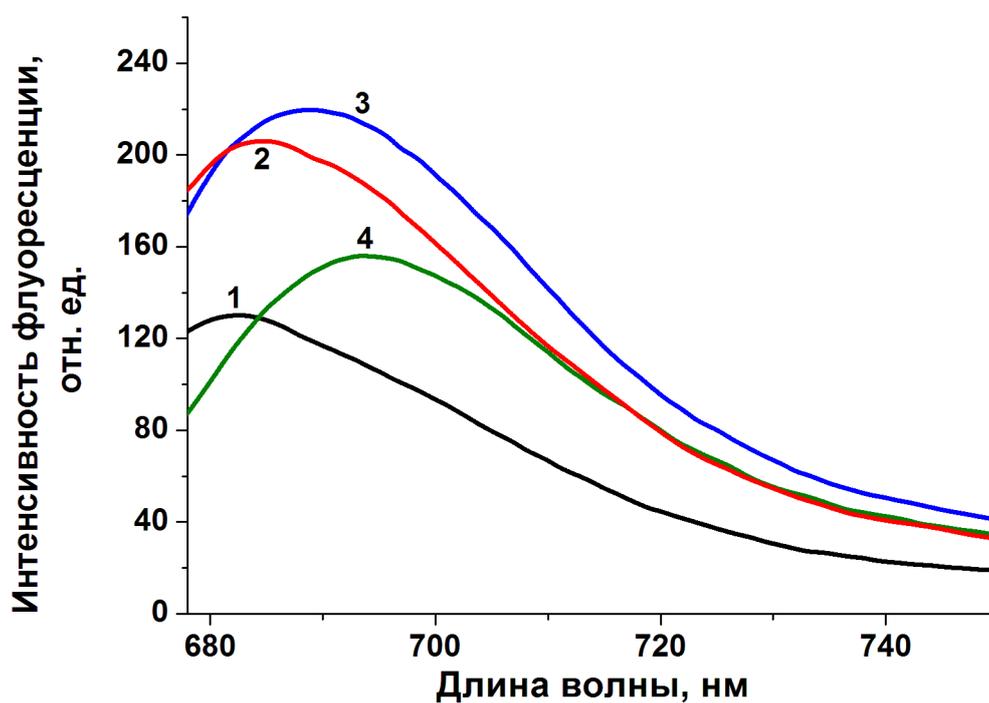
Рисунок 31. Зависимость эффективной константы скорости  $k_{эфф}$  фотоокисления триптофана ( $1,5 \times 10^{-5}$  М) от концентрации метиленового синего

#### 4.1.1. Спектральные свойства МС

Высказанное предположение о росте содержания агрегатов МС при увеличении его концентрации в растворе нашло свое подтверждение при анализе влияния концентрации МС на его спектральные свойства (рис. 32). На рисунке 32 представлены ЭСП (а) и спектры флуоресценции (б) МС в воде при разных концентрациях красителя. Как следует из рисунка 32 а, в спектре поглощения МС присутствует довольно интенсивная ( $\epsilon \sim 6,5 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ) асимметричная полоса поглощения с основным пиком  $\lambda = 665 \text{ нм}$  ( $D_{max}$ ), соответствующая мономерной форме красителя, и небольшое плечо в области  $\lambda = 610 - 615 \text{ нм}$  ( $D_{плечо}$ ), которое относят к димерной форме красителя [87]. 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  $\text{мономер} \rightleftharpoons \text{димер}$  сдвигается вправо (рис. 32 а) [87, 88, 90]. Об этом свидетельствует падение величины  $\varphi$  ( $\varphi = D_{max}/D_{плечо}$ , где  $D_{max}$  – оптическая плотность полосы с  $\lambda = 665 \text{ нм}$ ,  $D_{плечо}$  – оптическая плотность полосы с  $\lambda = 610 - 615 \text{ нм}$ ) с ростом концентрации МС в растворе (таблица 5) [199]. В спектре флуоресценции МС с увеличением концентрации красителя с  $2,5 \times 10^{-6} \text{ М}$  до  $1 \times 10^{-5} \text{ М}$  наблюдаются рост интенсивности и батохромный сдвиг полосы флуоресценции ( $\lambda = 682 \text{ нм}$ ) красителя (рис. 32 б, кривые 1 – 3), что также свидетельствует о димеризации молекул МС. При дальнейшем повышении концентрации антраценового красителя наблюдается концентрационное тушение флуоресценции МС (рис. 32 б, кривая 4), что связано с образованием, вероятно, более крупных ассоциатов молекул флуорофора.



а)



б)

Рисунок 32. а) – ЭСП и б) – спектры флуоресценции МС при концентрациях  $2,5 \times 10^{-6}$  (1),  $5 \times 10^{-6}$  (2),  $1 \times 10^{-5}$  (3) и  $2 \times 10^{-5}$  М (4)

**Таблица 5.** Соотношение  $\varphi = D_{max}/D_{плечо}$  при разных концентрациях МС

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

Таким образом, повышение концентрации МС в воде приводит к сдвигу равновесия мономер  $\rightleftharpoons$  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.

#### 4.2. Особенности фотокаталитической активности систем МС-АП

На рисунке 33 приведены зависимости  $k_{эфф}$  реакций фотоокисления ТРП, катализируемых системами МС-АП, от концентрации полимеров. Видно, что амфифильные полимеры повышают фотокаталитическую активность красителя, что отражается в росте эффективной константы скорости фотоокисления  $k_{эфф}$ , причем зависимость  $k_{эфф} = f(C_{АП})$  для системы МС-плюроники описывается кривыми с насыщением (рис. 33, кривые 1, 2). Для систем МС-ПВП и МС-ПЭГ при повышении концентрации АП наблюдается экстремальный ход зависимости  $k_{эфф} = f(C_{АП})$ . Наибольшее влияние на фотосенсибилизирующую активность красителя оказывают ПВП и ПЭГ. Разный ход зависимостей для мицеллообразующих (плюроники F127, F108; рис. 33, кривые 1, 2) и мицелло-необразующих полимеров (ПВП, ПЭГ; рис. 33, кривые 3, 4) связан с разным характером взаимодействия красителя с этими группами полимеров. Метиленовый синий, содержащий в структуре атомы серы и азота (рис. 20 б), в силу достаточной полярности при солубилизации плюрониками локализуется, очевидно, в гидрофильной «опушке» полимера [200]. Как было показано ранее,

молекулы солюбилизованного триптофана используемого в качестве субстрата, располагаются в той же области мицеллы, что способствует сближению реагентов и увеличению скорости фотоокисления (мицеллярный эффект) [201]. С ростом концентрации плуроника происходит разагрегация молекулярных ассоциатов МС, что также приводит к росту эффективной константы скорости фотоокисления триптофана, причем «запределевание» зависимости  $k_{эфф} = f(C_{АП})$  может свидетельствовать о максимальной степени разагрегации МС в присутствии плуроников.

Интересно, что в присутствии ПВП и ПЭГ значение  $k_{эфф}$  увеличивается больше, чем в присутствии плуроников, т.е. основной вклад в эффект повышения скорости процесса вносит характер связывания (прочность, степень разагрегирования) АК макромолекулами АП. Экстремальный характер кривых  $k_{эфф} = f(C_{АП})$  для ПВП и ПЭГ связан, очевидно, с возрастанием степени неэффективной адсорбции красителя 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  $k_{эфф}$ .

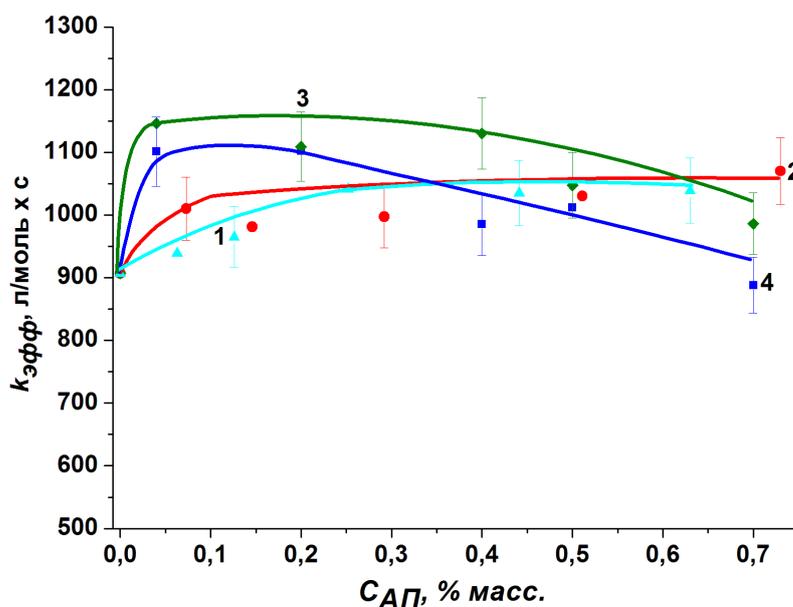


Рисунок 33. Зависимости  $k_{эфф}$  фотоокисления триптофана ( $1,5 \times 10^{-5}$  М) в присутствии МС ( $2,5 \times 10^{-6}$  М) и АП от концентрации амфифильных полимеров F127 (1), F108 (2), ПЭГ (3) и ПВП (4)

Важно отметить, что ММ полимера не влияет на экстремальный ход зависимости  $k_{эфф} = f(C_{АП})$  МС-АП. Из рисунка 34 видно, что вне зависимости от ММ ПЭГ характер кривых одинаков и также с увеличением концентрации полимера в реакционной системе наблюдается уменьшение величины  $k_{эфф}$ .

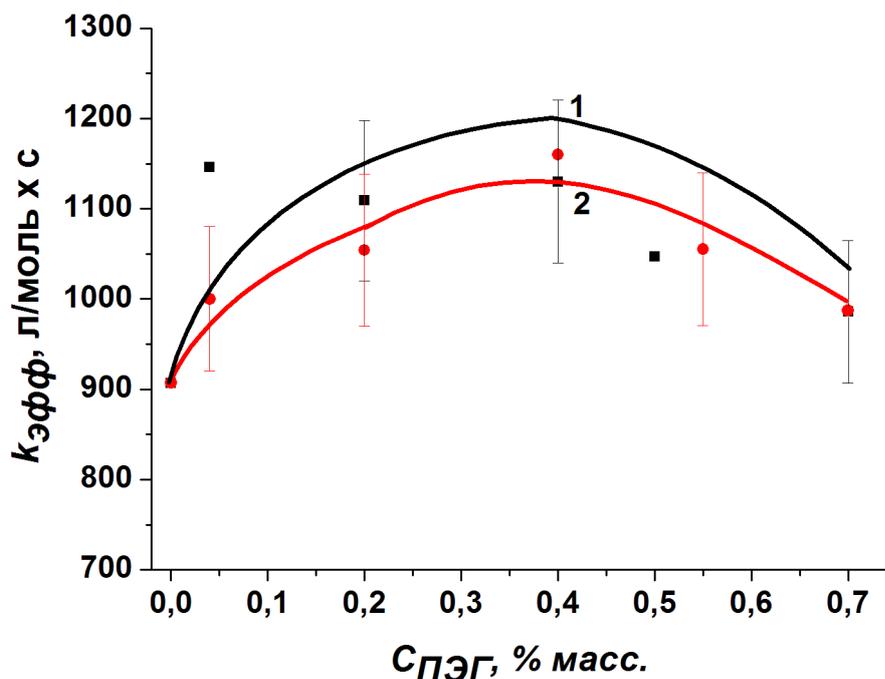


Рисунок 34. Зависимости  $k_{эфф}$  фотоокисления триптофана ( $1,5 \times 10^{-5}$  М) в присутствии МС ( $2,5 \times 10^{-6}$  М) и ПЭГ ММ 40 кДа (1) и 10 кДа (2) от концентрации полиэтиленгликоля

#### 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 ( $\lambda = 665$  и  $620$  нм) в ЭСП красителя и рост интенсивности флуоресценции МС (таблица 6). Причем наибольший рост оптической плотности и интенсивности флуоресценции МС наблюдается в присутствии ПВП и ПЭГ, что соответствует вышеприведенным кинетическим данным и свидетельствует о наибольшей агрегации МС в присутствии этих полимеров.

**Таблица 6.** Влияние АП на спектры поглощения и флуоресценции МС в воде

Образец	Оптическая плотность		$D_{max}/D_{плечо}$	Интенсивность флуоресценции, отн. ед.
	$D_{665\text{нм}} (D_{max})$	$D_{620\text{нм}} (D_{плечо})$	$\varphi$	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

где [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 6, величина  $\varphi$  практически не меняется в присутствии АП даже при высоких содержаниях АП.

#### 4.3. $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопия МС, ПВП и системы МС-ПВП

Для подтверждения возможного взаимодействия красителя с АП были изучены  $^1\text{H}$ -ЯМР спектры МС, поливинилпирролидона и их смеси (соотношение 1:1 по массе) в  $\text{D}_2\text{O}$  (таблица 7). Как видно из таблицы 7, для системы МС-ПВП наблюдаются сдвиги сигналов протонов как у молекул красителя, так и у молекул 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.

**Таблица 7.** Химические сдвиги протонов для МС, ПВП и МС-ПВП (1:1 по массе) в D<sub>2</sub>O, 22,4 °С

Положение протонов в молекуле МС*	Сигналы протонов МС, м. д.	Положение протонов в молекуле ПВП**	Сигналы протонов ПВП, м. д.	Сигналы протонов МС в присутствии ПВП, м. д.	Сигналы протонов ПВП в присутствии МС, м. д.
1	7,14	6	3,84 3,68	7,27	3,74 3,59
3	6,89	9	3,35	6,99	3,23
2	6,66	7	2,48 2,36	6,76	2,38 2,24
4	3,01	8	2,07	3,06	-
		5	1,77 1,61 1,20		1,64 1,51

где \* – положение сигналов протонов в молекуле МС, обозначенное на рисунке 20 б;

\*\* – положение сигналов протонов в молекуле ПВП, обозначенное на рисунке 21 а

Аналогичные взаимодействия, приводящие к образованию слабосвязанных комплексов ФС-АП, обнаруживаемых методом <sup>1</sup>H-ЯМР спектроскопии, наблюдались ранее в водных растворах, содержащих водорастворимые

порфирины – хлорин  $e_6$ , димегин (динатриевая соль протопорфирина IX) и фотодитазин, а также плуроники, ПВП и ПЭГ [202, 203].

#### 4.4. Размер частиц МС, АП и систем МС-АП в водной фазе по данным метода ДРС

Методом динамического рассеяния света определены величины гидродинамических диаметров частиц исходного МС, амфифильных полимеров, а также систем МС-АП в соотношении 1:1 по молям (таблица 8). Размеры частиц метиленового синего в воде составляют  $\sim 4,2$  нм (молекулы МС, находящиеся в слабоагрегированном состоянии, димеры, тримеры), и  $\sim 122$  нм, которые соответствуют агломератам АК. При добавлении АП в водный раствор, содержащий краситель, размер частиц агрегированных молекул МС уменьшается до  $\sim 118$  нм, что подтверждает частичную разагрегацию АК в системе МС-АП.

**Таблица 8.** Средний размер частиц МС, АП и систем МС-АП в водных растворах, определенный методом динамического рассеяния света при  $t = 20$  °С

Образец	Размер частиц, нм
МС	$4,2 \pm 2,4$
	$122,0 \pm 43,8$
ПВП	$7,5 \pm 3,8$
	$36,6 \pm 13,6$
МС+ПВП	$8,8 \pm 4,8$
	$118,3 \pm 34,4$
F108	$5,4 \pm 1,1$
	$77,8 \pm 11,1$
МС+F108	$5,6 \pm 4,5$
	$118,4 \pm 35,6$

где  $[МС] = 2 \times 10^{-3}$  М,  $[ПВП] = 2 \times 10^{-3}$  М,  $[F108] = 2 \times 10^{-3}$  М  
для систем МС-АП соотношение 1:1 по молям

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  $^1\text{H}$ -ЯМР спектрах, уменьшение размера частиц АК (как показано методом ДРС), а также некоторый 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 антраценовых красителей – бенгальского розового и метиленового синего можно повысить, одновременно используя 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 фотосенсиблизированного 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 35 приведены зависимости эффективной константы скорости  $k_{эфф}$  реакции фотоокисления триптофана в присутствии БР ( $2 \times 10^{-6}$  М и  $5 \times 10^{-6}$  М) от концентрации хитозана (кривые 1 и 2 соответственно). Видно, что хитозан уже

при минимальной концентрации в растворе ( $5 \times 10^{-3}$  % масс.) понижает величину  $k_{эфф}$  более, чем в два раза, вне зависимости от концентрации красителя в растворе, но последующее увеличение его содержания в растворе уже не влияет на величину константы скорости. В связи с этим дальнейшие кинетические и спектральные исследования проводили при данной концентрации хитозана  $5 \times 10^{-3}$  % масс.

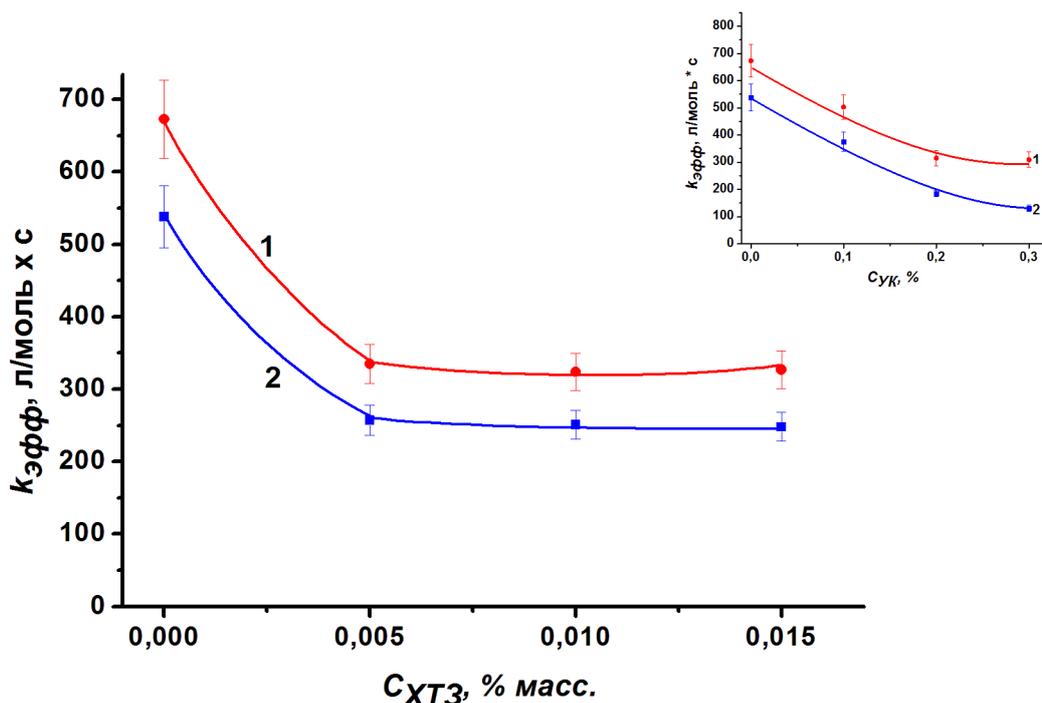
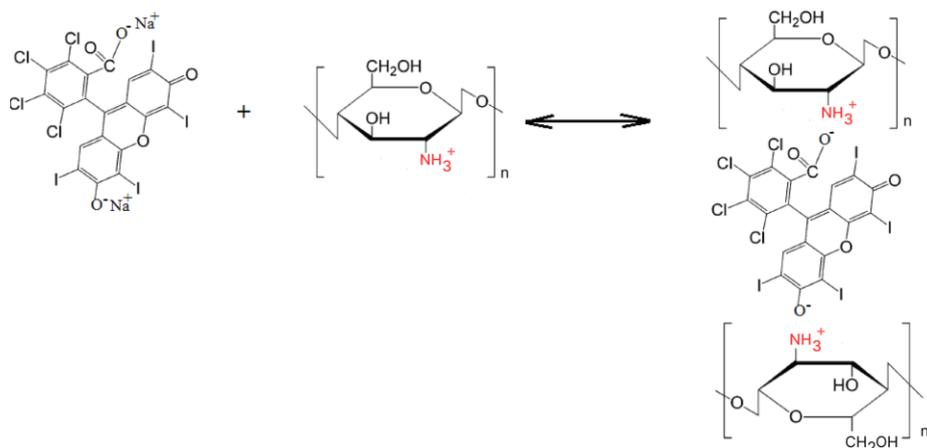


Рисунок 35. Зависимости  $k_{эфф}$  фотоокисления триптофана в присутствии бенгальского розового в PBS среде от концентрации хитозана.

Врезка – зависимости  $k_{эфф}$  реакции фотоокисления ТРП, катализируемой БР в PBS среде в присутствии УК от концентрации УК. [БР] =  $2 \times 10^{-6}$  М (1) и  $5 \times 10^{-6}$  М (2), [ТРП] =  $1 \times 10^{-4}$  М

Приведенные на рисунке 35 зависимости говорят о взаимодействии дианионов БР с протонированными аминогруппами хитозана и о существовании равновесия [204]:



Как следует из рисунка 35, молекулы БР, не связанные с полимерной цепью полисахарида, сохраняют определенную фотокаталитическую активность, но указанное равновесие может существовать только в условиях буферной среды, где рН для системы БР-ХТЗ равен 4,5. Действительно, оказалось, что введение хитозана в реакцию фотоокисления триптофана в присутствии БР в водном растворе приводит к падению фотокаталитической активности красителя в 25 раз (почти до нуля), что может говорить о практически полном связывании бенгальского розового с полимерной цепью ХТЗ. Поскольку хитозан растворяется только в слабокислой среде (рН = 4,5), было также изучено влияние уксусной кислоты (УК) на величину  $k_{эфф}$  окисления триптофана в PBS при концентрациях БР  $2 \times 10^{-6}$  М и  $5 \times 10^{-6}$  М (рис. 35, врезка).

Оказалось, что введение уксусной кислоты вплоть до концентрации 0,1 % УК (соответствующей содержанию кислоты в 0,005 % масс. растворе ХТЗ) вызывает уменьшение величины  $k_{эфф}$ , но не столь сильное, как это наблюдается в присутствии ХТЗ (рис. 35, кривые 1, 2 и врезка). Следует отметить, что рН раствора с содержанием УК  $\leq 0,1\%$  остается равным 4,5. При дальнейшем увеличении содержания кислоты рН раствора уменьшается до 4-3,5 и наблюдается падение значений  $k_{эфф}$ , что, вероятнее всего, связано с образованием неактивной лактонной формы красителя [66, 67]. Дальнейшие исследования фотосенсибилизирующих и спектральных свойств тройных систем БР-АП-ХТЗ в PBS были проведены при концентрации ХТЗ 0,005 % масс. и рН = 4,5.

### 5.1.2. Влияние АН на фотокаталитическую активность МС в водном растворе

Как уже упоминалось, для исследования возможности использования в ФДТ МС одновременно с альгинатом натрия были проведены исследования влияния АН на фотосенсибилизирующую активность МС в реакции фотоокисления триптофана (рис. 36). Из рисунка 36, на котором приведены зависимости  $k_{эфф}$  фотоокисления триптофана в присутствии МС ( $C = 2,5 \times 10^{-6}$  и  $5 \times 10^{-6}$  М, кривые 1 и 2 соответственно) от концентрации АН, следует, что величина эффективной константы скорости  $k_{эфф}$  падает в 1,5 – 3,5 раза при добавлении АН в водный раствор метиленового синего. Дальнейшее повышение концентрации альгината натрия практически не влияет на величину  $k_{эфф}$ . Наблюдаемые зависимости могут говорить об ионном взаимодействии положительно заряженного красителя с отрицательно заряженным полисахаридом.

Запределевание кривых 1 и 2 определяется концентрацией метиленового синего. При повышении концентрации МС ( $C = 5 \times 10^{-6}$  М) наблюдается более эффективное связывание красителя с полимерными цепями АН, что приводит к более сильному понижению величины  $k_{эфф}$  (рис. 36, кривая 2) по сравнению с  $k_{эфф}$  при концентрации МС –  $2,5 \times 10^{-6}$  М (рис. 36, кривая 1). Кроме того, наблюдаемая зависимость может быть связана с тем, что с увеличением содержания МС в системе МС-АН растет содержание димеров в реакционном растворе, что также уменьшает величину  $k_{эфф}$ .

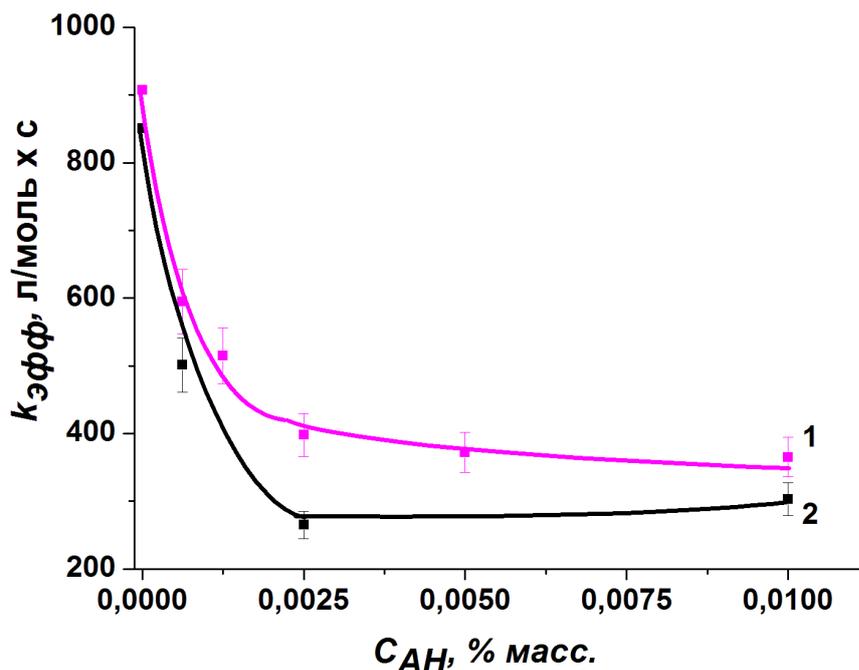


Рисунок 36. Зависимости эффективной константы скорости  $k_{эфф}$  фотоокисления триптофана ( $1,5 \times 10^{-5}$  М) в присутствии МС ( $2,5 \times 10^{-6}$  М) (1) и ( $5 \times 10^{-6}$  М) (2) от концентрации альгината натрия

## 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 37, АП практически полностью блокируют ионное взаимодействие БР с ХТЗ и восстанавливают фотокалитическую 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. 37, синяя точка). Возможно, в слабокислом растворе хитозана протонированные аминогруппы ПС взаимодействуют с карбонильными группами пирролидонового 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 (рис. 37).

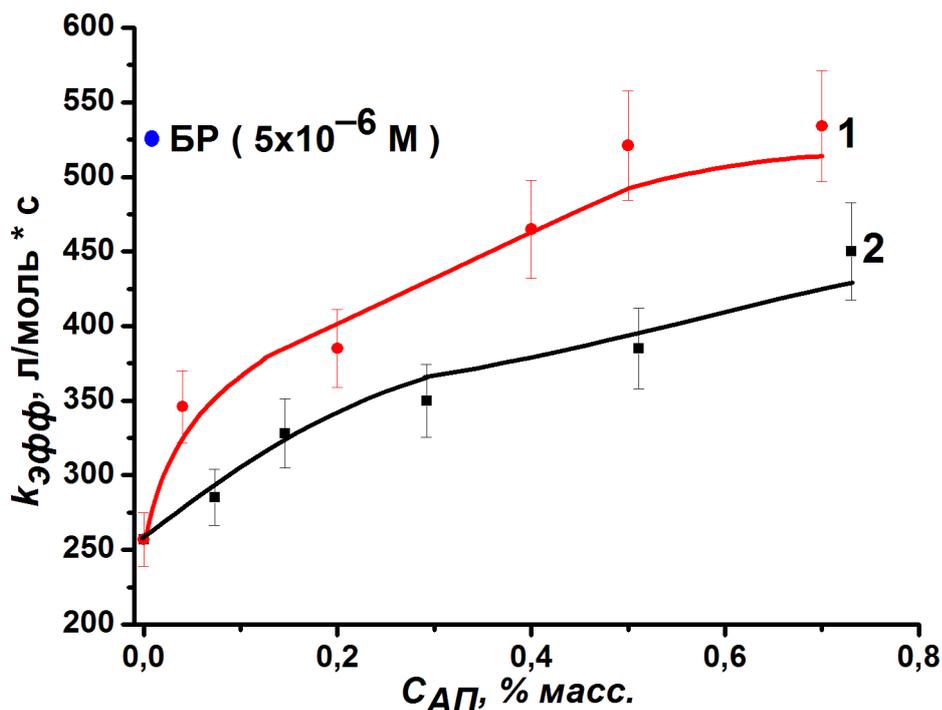


Рисунок 37. Зависимости  $k_{эфф}$  фотоокисления ТРП ( $1 \times 10^{-4}$  М) в присутствии БР ( $5 \times 10^{-6}$  М) и ХТЗ (0,005 % масс.) при добавлении ПВП (1) и плуроника F108 (2) от концентрации полимеров:  $[АП] = 0 - 0,8$  % масс. Краситель и АП были растворены в PBS среде. Синяя точка – фотосенсибилизирующая активность  $[БР] = 5 \times 10^{-6}$  М

Аналогичные закономерности наблюдаются при введении амфифильных полимеров в систему МС-АН. На рисунке 38 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. 38, кривые 1, 2). В то же время введение плуроника F108 в систему МС-АН лишь незначительно повышает величину константы скорости (рис. 38, 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. В работе [205] было описано взаимодействие гидроксильных групп полисахарида с атомами

кислорода эфирных групп ПЭГ, что, очевидно, препятствует образованию комплекса МС-АП.

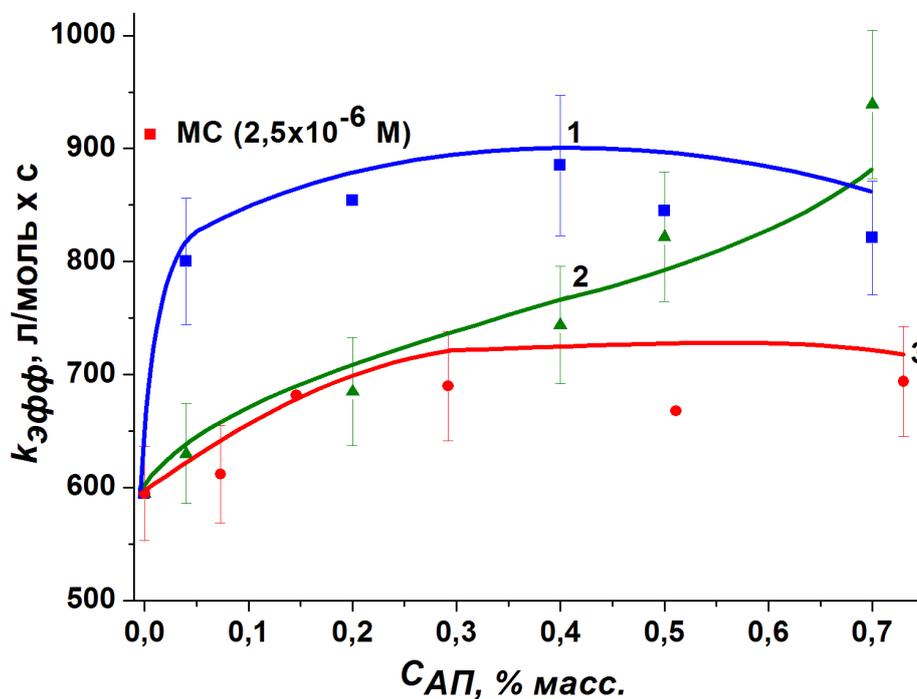


Рисунок 38. Зависимости эффективной константы скорости  $k_{эфф}$  фотоокисления триптофана ( $1,5 \times 10^{-5}$  М) в присутствии МС ( $2,5 \times 10^{-6}$  М) и АП (0,000625 % масс.) при добавлении ПВП (1), ПЭГ (2) и F108 (3).  $[АП] = 0 - 0,73$  % масс. Красная точка – фотосенсибилизирующая активность  $[МС] = 2,5 \times 10^{-6}$  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 влияет на положение и интенсивность полос 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. 39, 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 [184].

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 (рис. 39 а, б) [206]. В частности, как следует из рисунка 39 а, при добавлении плуроника F108 и ПВП в систему БР-ХТЗ наблюдается батохромный сдвиг (по сравнению с положением полосы поглощения БР в PBS в отсутствие АП и ХТЗ, 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. При этом происходит рост оптической плотности  $D$  полос поглощения, в случае системы БР-ПВП-ХТЗ – до величины  $D$  исходного БР (рис. 39 а, кривая 1). Интересно отметить, что в тройной системе БР-ПВП-ХТЗ поливинилпирролидон, возможно, взаимодействует с полисахаридом и красителем, поскольку, как было показано ранее (глава 3, стр. 65 – 66), при добавлении ПВП к раствору БР наблюдался и батохромный сдвиг полосы поглощения БР, и рост ее оптической плотности. В то же время в присутствии АП и ХТЗ (рис. 39 б, кривые 3 и 4 соответственно) наблюдаются значительный рост интенсивности флуоресценции БР по сравнению с исходным БР (рис. 39 б, кривая 1), и батохромный сдвиг полос флуоресценции красителя на 10 – 15 нм, что говорит не только об экранировании молекул БР от взаимодействия с ХТЗ, но и об агрегации надмолекулярных образований красителя в присутствии АП [121].

Следует отметить, что увеличение содержания плуроника F108 (рис. 39 а, врезка) в системе БР-F108-ХТЗ не позволяет достичь исходных значений оптической плотности чистого БР. Возможно, это обусловлено частичным разрушением исходной мицеллярной структуры плуроника в слабокислой среде ( $\text{pH} = 4,5$ ) [104].

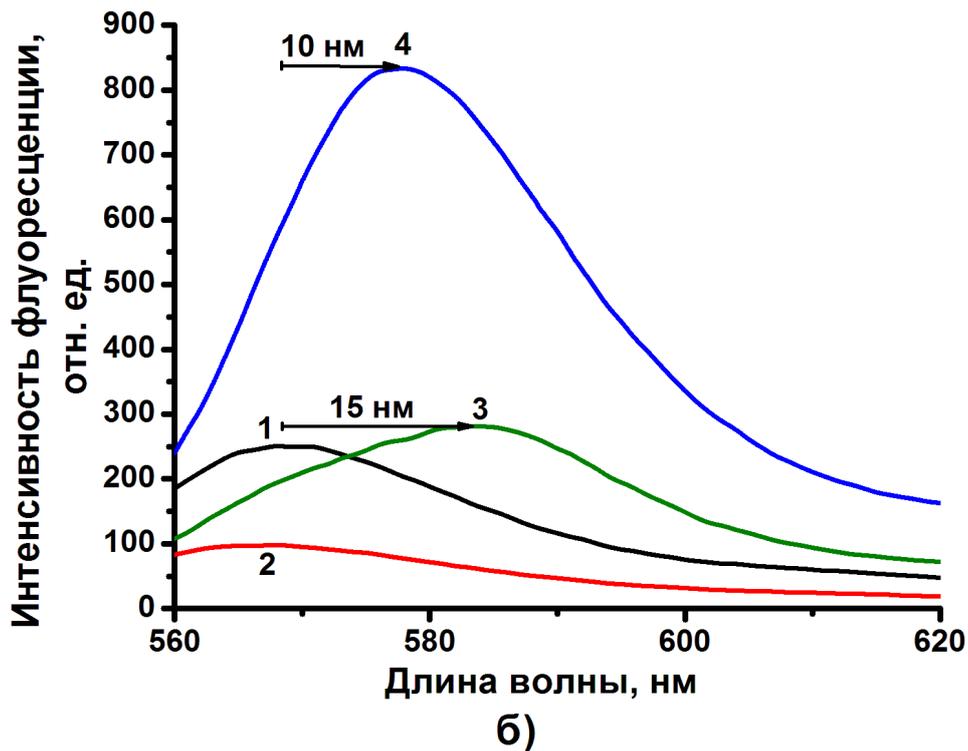
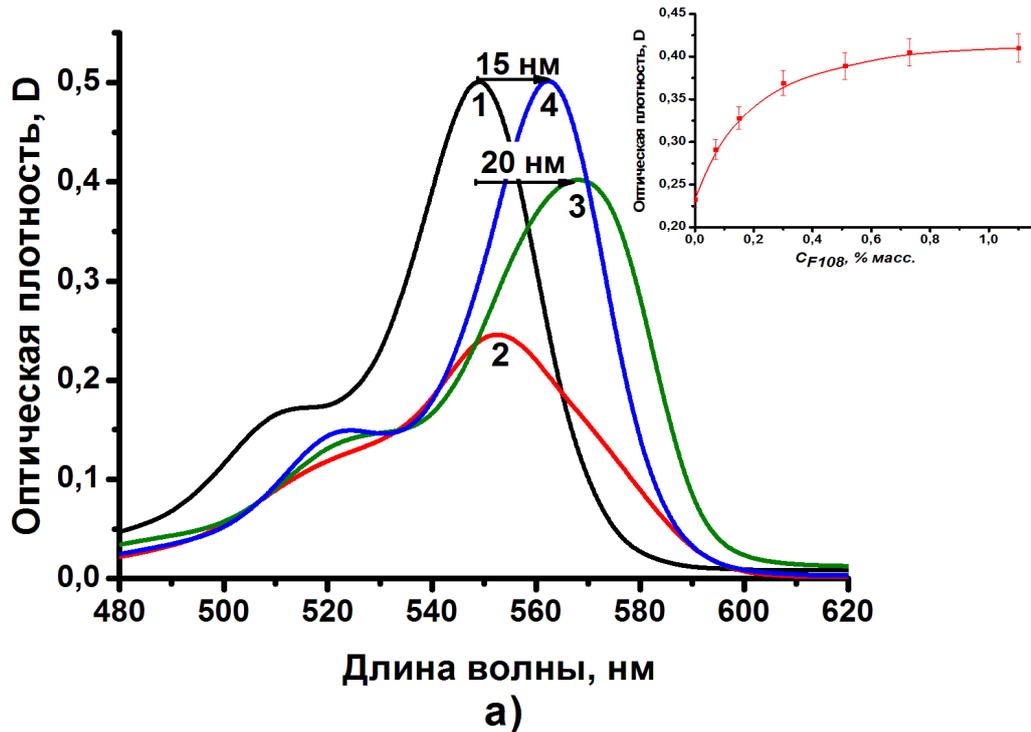
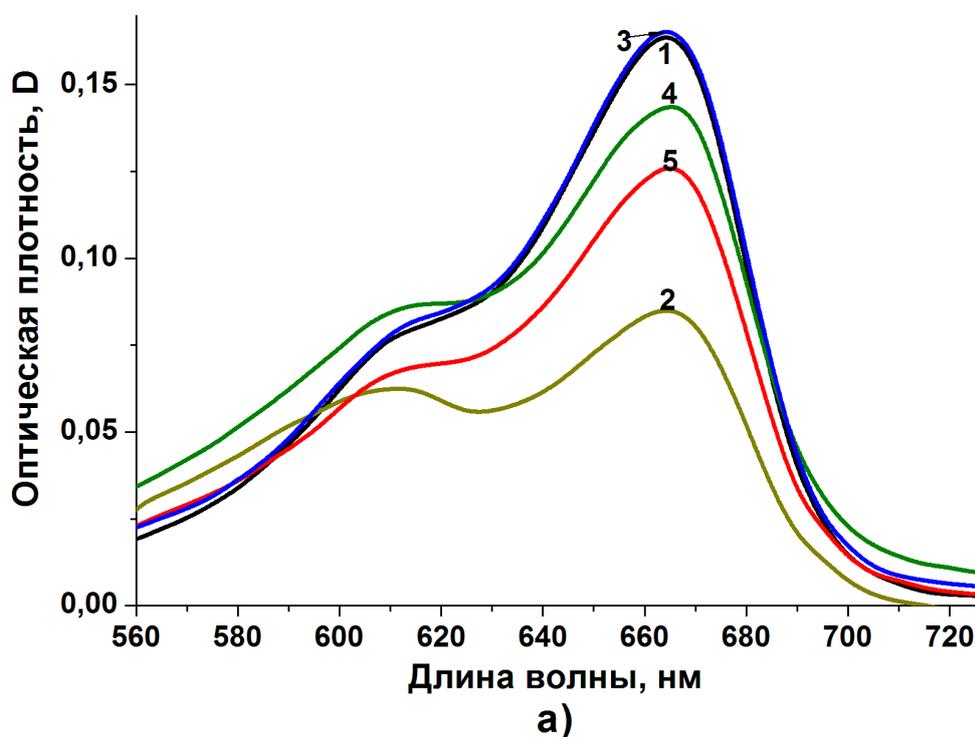


Рисунок 39. а) – Электронные спектры поглощения и б) – спектры флуоресценции [БР] =  $5 \times 10^{-6}$  М в PBS (1), БР-ХТЗ (2), БР-F108-ХТЗ (3), БР-ПВП-ХТЗ (4), где [F108] = 0,73 % масс., [ПВП] = 0,2 % масс. и [ХТЗ] = 0,005 % масс.

Врезка – зависимость оптической плотности полосы поглощения при  $\lambda = 555$  нм и 570 нм системы БР-ХТЗ при добавлении F108 от концентрации плуроника (0 – 1,1 масс. %)

### 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 [192]. Как следует из рисунка 40 а и б, оптическая плотность обеих полос поглощения и интенсивность флуоресценции МС в присутствии АН падают на  $\sim 50\%$  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). Как было показано выше (стр. 87 – 88), при добавлении ПВП происходит восстановление фотокаталитической активности МС в присутствии АН в процессе фотоокисления триптофана (рис. 38, кривая 1).



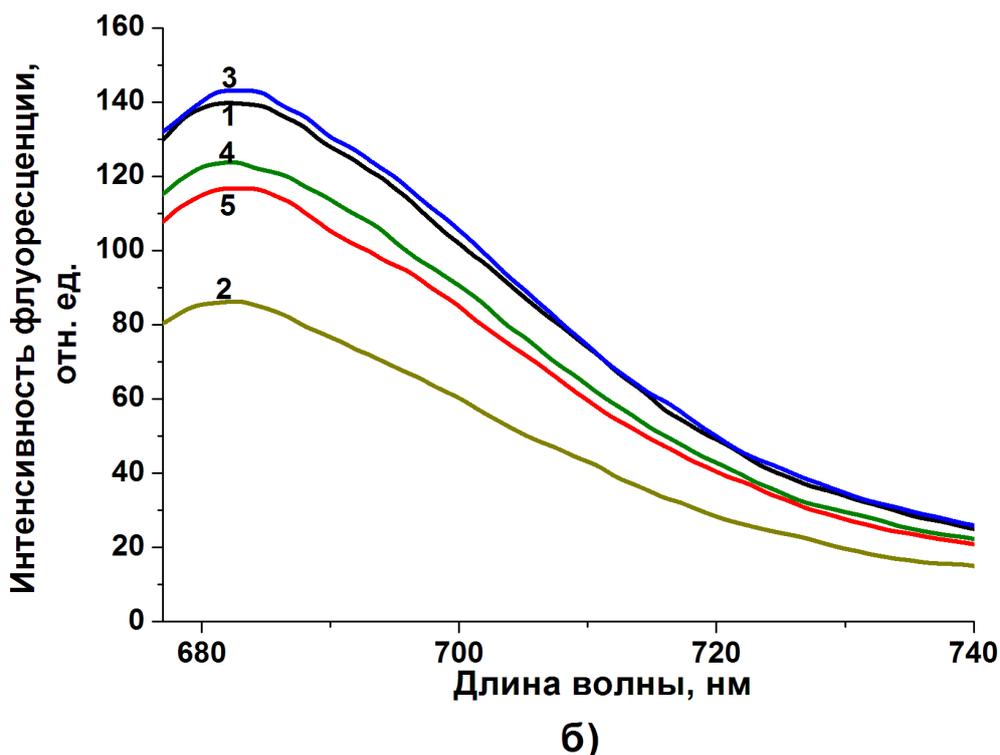


Рисунок 40. а) – ЭСП и б) – спектры флуоресценции МС ( $2,5 \times 10^{-6}$  М) в воде (1), МС-АН (2), МС-ПВП-АН (3), МС-ПЭГ-АН (4), МС-F108-АН (5), где [F108] = 0,73 % масс., [ПВП и ПЭГ] = 0,7 % масс. и [АН] = 0,000625 % масс.

В то же время увеличение содержания ПЭГ и плуроника F108 в системе МС-АН не позволяет получить исходный ЭСП и спектр флуоресценции МС (рис. 41 а, б, кривая 2 и 3 соответственно), т.е. часть молекул МС остается связанной с АН, что, возможно, связано с более слабым взаимодействием МС с гидрофильным ПЭГом и плуроником F108 [205].

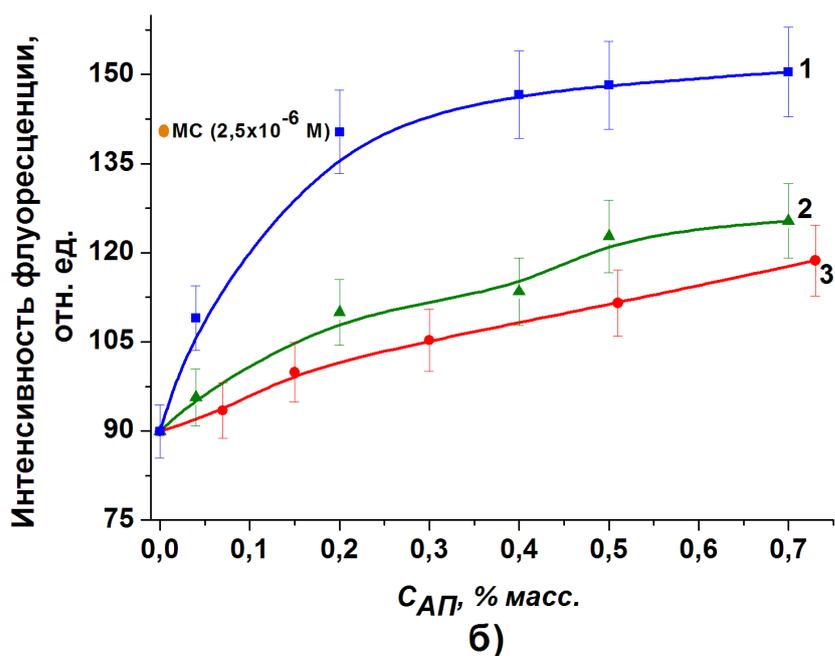
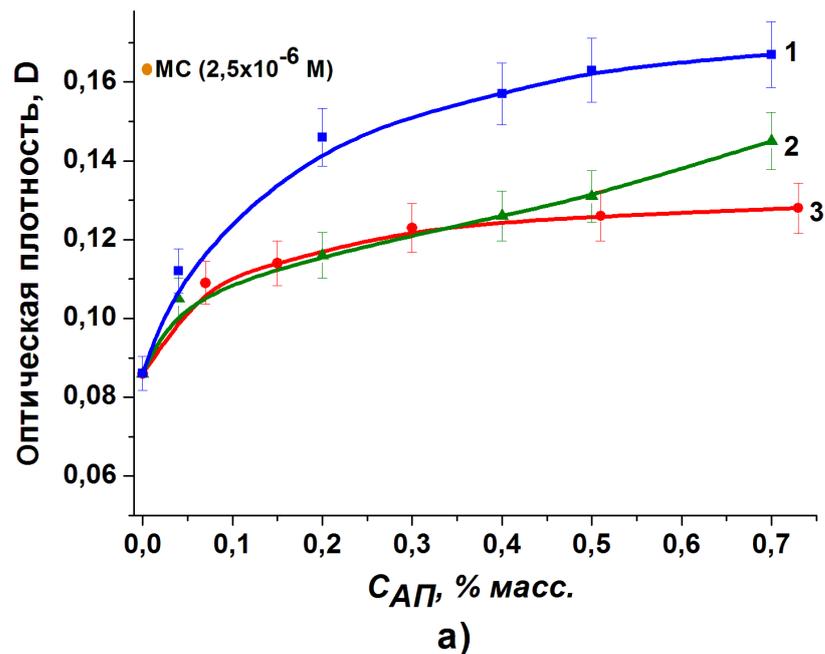


Рисунок 41. а) – Зависимости оптической плотности полосы поглощения при  $\lambda = 665 \text{ нм}$  и б) – интенсивности флуоресценции полосы ( $\lambda = 683 \text{ нм}$ ) системы МС-АН в присутствии АП: ПВП (1), ПЭГ (2) и F108 (3) от концентрации полимеров (0 – 0,73 % масс.),  $[MC] = 2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $[АН] = 0,000625 \text{ \% масс.}$

Оранжевыми точками отмечены значения оптической плотности исходного МС при  $\lambda = 665 \text{ нм}$  (а) и интенсивности флуоресценции красителя при  $\lambda = 685 \text{ нм}$  (б),  $[MC] = 2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$

#### 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 9 и 10). Из таблицы 9 следует, что анизотропия флуоресценции ( $r$ ) чистого бенгальского розового в водном и PBS растворе составляет 0,26 – 0,27, что согласуется с литературными данными [207]. 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. При этом у антраценового красителя и ПВП возникают заметно более прочные взаимодействия, чем у БР с плуроником, и, соответственно, рост  $r$  в присутствии ПВП существенно больше, чем в системе БР-F108, что соответствует описанным в 3 главе спектральным данным.

Добавление ХТЗ в водный и буферный растворы БР по-разному влияет на величину  $r$ . Как видно, значение  $r$  в PBS растворе практически не меняется в присутствии полисахарида, что, очевидно, свидетельствует о большей стабильности структуры флуорофора в фосфатно-солевом растворе с  $I = 0,14$  моль/л [208] и, следовательно, меньшей чувствительности анизотропии  $r$  к молекулярному окружению по сравнению с соответствующими водными растворами. Действительно, в водном растворе в присутствии хитозана благодаря ионным взаимодействиям с протонированными аминогруппами полисахарида свобода вращения флуорофора уменьшается, что ведет к повышению анизотропии флуоресценции [209]. При этом величина  $r$  практически не меняется в присутствии уксусной кислоты.

Интересно, что при добавлении амфифильных полимеров F108 и ПВП к водному раствору БР и хитозана с  $r = 0,32$  анизотропия падает в 3,0 и 1,3 раза соответственно. АП, взаимодействуя с красителем, обеспечивают ему большую подвижность благодаря разрыву ионных связей с хитозаном. Особенно заметно это проявляется в случае мицеллообразующего плуроника F108, где БР в объеме

мицелл преимущественно находится в индивидуальном молекулярном состоянии. Снижение анизотропии флуоресценции БР в 1,2 раза в системе БР-F108-ХТЗ наблюдается даже в буферном растворе. Важно отметить, что снижение анизотропии флуоресценции в присутствии АП происходит в основном для мицеллообразующего плуроника F108, для ПВП этот эффект не так выражен. Это еще раз подчеркивает, что степень анизотропии флуоресценции уменьшается для неагрегированных молекул флуорофоров в их разбавленных растворах.

**Таблица 9.** Анизотропия флуоресценции ( $r$ ) БР в отсутствии 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	$0,26 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,01$
БР+УК	$0,26 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,01$
БР+ХТЗ	$0,32 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,01$
БР+F108	$0,27 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,01$
БР+F108+ХТЗ	$0,09 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,01$
БР+ПВП	$0,31 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$
БР+ПВП+ХТЗ	$0,23 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$

где [БР] =  $5 \times 10^{-6}$  М, [УК] = 0,1 % масс., [ХТЗ] = 0,005 % масс., [F108] = 0,15 % масс., [ПВП] = 0,2 % масс.

Из таблицы 10 следует, что степень поляризации МС с концентрацией  $2,5 \times 10^{-6}$  М в исходном водном растворе составляет  $r = 0,087$ , что согласуется с литературными данными [210]. 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 флуорофора 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 [211].

**Таблица 10.** Анизотропия флуоресценции МС, систем МС-АП, МС-АН и МС-АП-АН. Длина волны возбуждения 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	$0,094 \pm 0,002$

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

### 5.5. Исследование структуры поверхностей образцов АК, АК-АП, АК-ПС и АК-АП-ПС методом АСМ

Возможность взаимодействия полимеров с АК была исследована также методом атомно-силовой микроскопии участков поверхности образцов,

получаемых при испарении водных растворов, содержащих АК, АП и ПС, а также их смеси на слюде при комнатной температуре (рис. 42 и 43).

Из рисунка 42 а видно, что структура поверхности исходного образца БР представлена вытянутыми цилиндрическими образованиями. Плюроник F108 и хитозан образуют на поверхности слюды дендритоподобные структуры (рис. 42 б, в). Для полисахарида наблюдается более плотная укладка дендритов с мелкозернистой структурой, чем для плюроника, что, вероятно, связано с более высокой ММ хитозана (50 – 190 кДа) по сравнению с плюроником F108 (ММ 14,6 кДа) [212, 213]. В присутствии БР наблюдаются значительные изменения поверхностной структуры плюроника (рис. 42 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. 42 д) таким образом, что на мелкозернистой поверхности ХТЗ фиксируются ассоциаты БР-F108 в виде «островков» неправильной формы.

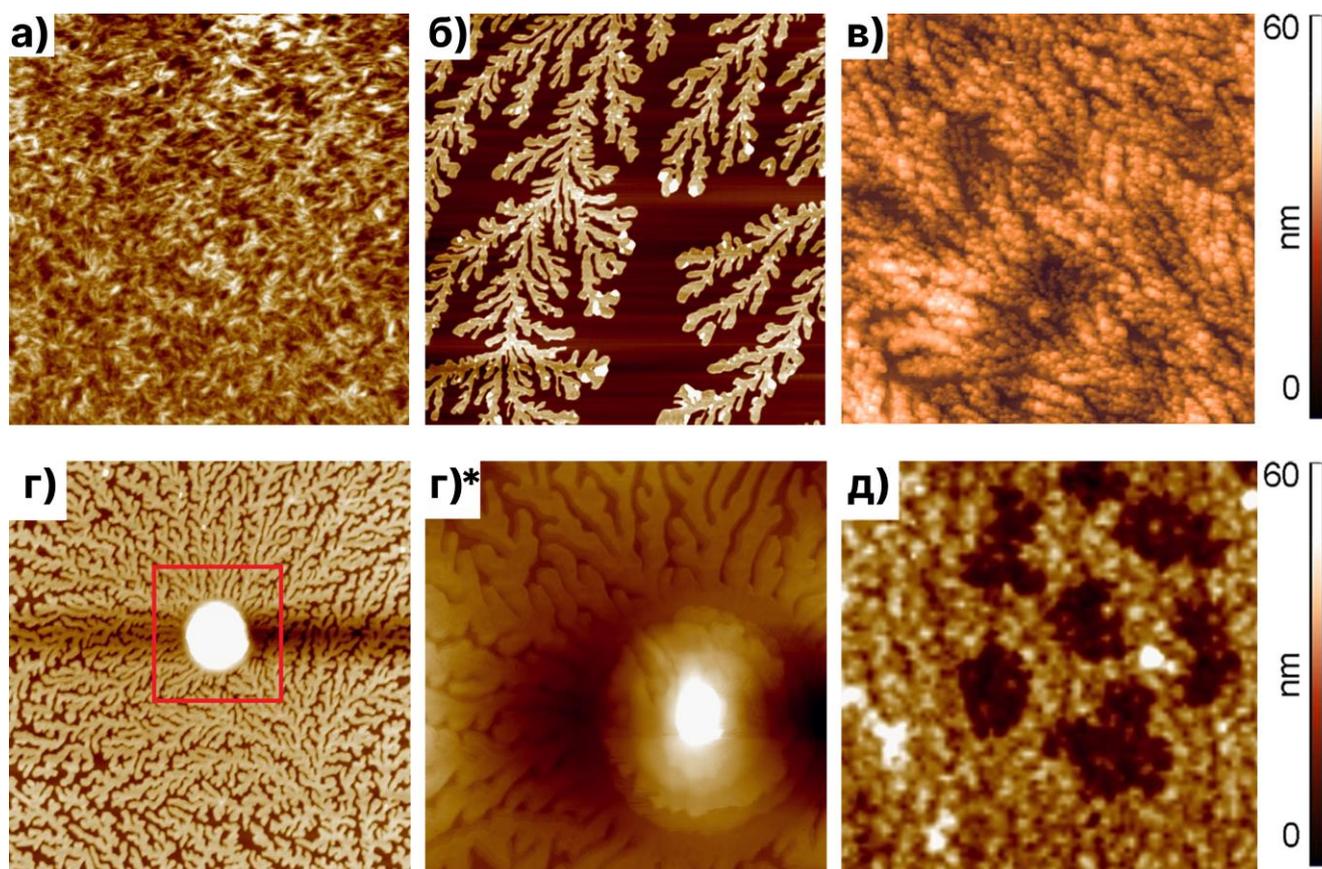


Рисунок 42. АСМ – изображения участков поверхности образцов БР ( $1 \times 10^{-3}$  М) (а), F108 (0,073 % масс.) (б), ХТЗ (0,005 % масс.) (в), БР-F108 (г и г\*) и БР-F108-ХТЗ (д) в режиме топографии. Размер изображений составлял  $10 \times 10$  мкм для а – д и  $3 \times 3$  мкм для г\*. Концентрации веществ в системах:  $[BR] = 5 \times 10^{-6}$  М,  $[F108] = 0,073$  % масс.,  $[ХТЗ] = 0,005$  % масс.

Структура поверхности исходного агрегированного МС ( $5 \times 10^{-5}$  М) представлена сфероподобными частицами размером 70 – 110 нм (рис. 43 а), которые более четко видны на рисунке 43 б – изображении, полученном в режиме фазового контраста. Добавление МС к альгинату натрия не влияет на структуру поверхности АН, на АСМ-изображении (рис. 43 в, г) наблюдается характерная для АН сетчатая структура, образованная волокнами полимера с шарообразными включениями метиленового синего размерами  $\sim 100$  нм (рис. 43 а). Для трехкомпонентной системы МС-F108-АН наблюдаются две отдельные фазы полимеров (рис. 43 д). Видно, что на альгинатной сетчатой подложке кристаллизуется плуроник F108 с характерной дендритоподобной структурой

[213], и с включениями частиц МС. В то же время, как видно из рисунка 43 е (режим фазового контраста), на поверхности плюроника визуализируется сферическое образование размером  $\sim 500$  нм в диаметре, которое, возможно, отвечает агломератам слабосвязанных комплексов плюроника F108 и красителя.

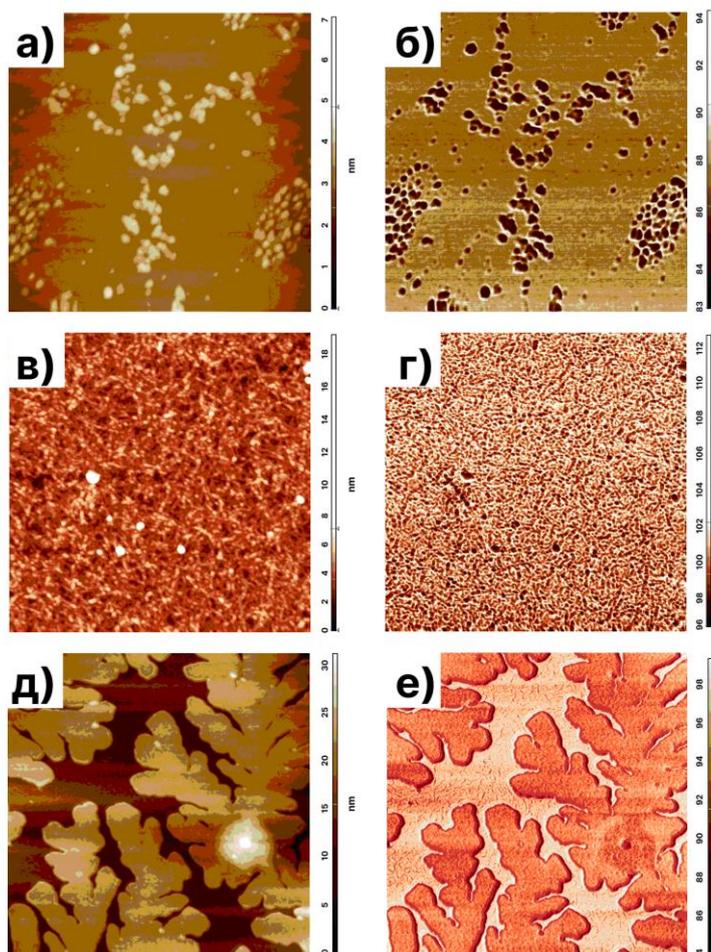


Рисунок 43. АСМ – изображения участков поверхности пленок МС ( $5 \times 10^{-5}$  М) (а, б), МС-АН (в, г) и МС-F108-АН (д, е). Изображения а, в, д сделаны в режиме топографии; б, г, е – в режиме фазового контраста. Размер изображений составлял  $3 \times 3$  мкм. Концентрации веществ в системах:  $[МС] = 2,5 \times 10^{-6}$  М,  $[F108] = 0,146$  % масс. и  $[АН] = 0,005$  % масс.

Таким образом, в данной главе выявлены закономерности влияния полисахаридов (ХТЗ, АН) и амфифильных полимеров (ПВП, ПЭГ, плюроник F108) на фотосенсибилизирующую активность АК в процессе фотогенерации

синглетного  $^1O_2$  кислорода (в реакции фотоокисления триптофана), а также на спектральные характеристики и поверхностную структуру красителей.

Показано, что ионное взаимодействие АК с ПС приводит к уменьшению величины  $k_{эфф}$  и к падению оптической плотности обеих 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 красителей восстанавливается. Образование комплекса АК-АП-ПС подтверждено методами электронной и флуоресцентной спектроскопии, а также с помощью анизотропии флуоресценции красителя. Кроме того, образование слабосвязанного комплекса БР-F108 и МС-F108 продемонстрировано методом АСМ.

## 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 агрегированию 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-полимеры.

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.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

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

#### 1) Создание модельной раны у лабораторных животных

В качестве экспериментальной модели была использована полнослойная плоская кожная рана [185].<sup>1</sup> Животным (65 крыс линии Вистар, самцы, вес 120 – 140 г) проводили анестезию путем внутримышечного (в/м) введения раствора Zoletil 100 (Virbac, Франция) в дозе 6 мг активного ингредиента на 1 кг массы тела животного. На предварительно депилированной коже спины (в межлопаточном пространстве) иссекали круг диаметром 8 – 10 мм, глубиной до собственной фасции. Тefлоновое муфтовое кольцо с внутренним диаметром 19,5 мм имплантировали в образовавшийся дефект, после чего наружный диаметр кольца закрывали перфорированной полиэтиленовой пленкой для предотвращения высыхания, внешнего загрязнения и сокращения раны. Раны у всех животных были стандартного размера 3 см<sup>2</sup>.

#### 2) Порядок проведения ФДТ

Сеансы ФДТ проводились на 2 и 3 сутки после операции. Животных наркотизировали в/м введением раствора Zoletil V = 50 мкл. С поверхности кольца снимали защитную пленку. Если в ране присутствовал экссудат, его убирали стерильным тампоном. После чего на раневую поверхность наносили раствор изучаемой композиции V = 1,0 мл (таблица 11). Далее лабораторных животных помещали в темную коробку на 15 мин. Сеансы обработки ран методом ФДТ проводили, используя в качестве источника излучения фототерапевтические

---

<sup>1</sup> *In vivo* эксперименты были проведены в ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

аппараты «АФС» ООО «Полироник». Характеристики светодиодов описаны в п. 2.2.1. Дно раны облучали расфокусированным пучком света (диаметр пятна облучения  $d \approx 0,75$  см), сканирующими круговыми перемещениями светодиода в течение 3 минут (для систем, где АК БР, группы № 3, 5 и 7) и 38 секунд (для систем, где АК МС, группы № 9, 11 и 13). Таким образом, для данных промежутков времени плотность энергии воздействия составляла 100 – 120 Дж/см<sup>2</sup>. После окончания проведения ФДТ поверхность раны снова закрывали полиэтиленовой пленкой.

**Таблица 11.** 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

где [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 – 10 и 13 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) а также с каждым из полимеров, использованных в качестве основы-носителя для красителей F108 и ПВП в отсутствии облучения (группы № 4, 6, 10 и 12).

### **3) Гистологический анализ**

Эффективность ФС при лечении ран у лабораторных животных методом ФДТ определяли с помощью гистологического анализа. Животных выводили из опыта методом ингаляции углекислого газа на 5 день эксперимента (96 часов после операции), ткани раны забирали для последующего гистологического исследования. Биологический материал фиксировали в нейтральном 10 % забуференном формалине и заливали в парафиновые блоки. Срезы образцов толщиной 4 – 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Полученные микроскопические препараты исследовали с использованием универсального микроскопа LEICA DM4000 B LED (Leica Microsystems, Германия), оснащенного цифровой видеокамерой LEICA DFC7000 T (Leica Microsystems, Германия).

### **4) Заключение**

Выявленные в данном исследовании клинико-морфологические особенности течения ранней стадии раневого процесса под действием ФДТ с использованием систем антраценовый краситель-амфифильный полимер позволяют сделать вывод о том, что плуроник F108 и поливинилпирролидон способны ослабить негативное воздействие БР и МС на микрососуды и предотвратить развитие местной геморрагической реакции, осложняющей заживление раны при проведении сеансов ФДТ с использованием МС и БР (таблица 11, группы № 3 и 9).

Важно и то, что лазерное облучение в сочетании с системами БР-F108 и МС-ПВП способствует ослаблению воспалительных и усилению репаративных процессов. В частности, при обработке раны системами БР-F108 (соотношение 1:8 по массе) и МС-ПВП (соотношение 1:4 по массе) с последующим облучением

светом определенной длины волны, соответствующей используемому красителю (530 нм для БР и 660 нм для МС) наблюдались выраженные регенеративные процессы в ране, а именно образование непрерывного слоя грануляционной ткани с созреванием фибробластов и новообразованных сосудов (таблица 11, группы № 5 и 13).

Таким образом, двухкомпонентные системы АК-АП являются эффективными ФС препаратами, которые могут быть использованы при лечении гнойных ран методом ФДТ.

**СПИСОК ПРИНЯТЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ**

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФС – фотосенсибилизатор

АК – антраценовый краситель

АФК – активные формы кислорода

$^1O_2$  – синглетный кислород

АФДТ – антибактериальная фотодинамическая терапия

ЭСП – электронный спектр поглощения

БР – бенгальский розовый

МС – метиленовый синий

АП – амфифильные полимеры

ППО – полипропиленоксид

ПЭО – полиэтиленоксид

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

КТМ – критическая температура мицеллообразования

ККГ – критическая концентрация гелеобразования

КТГ – критическая температура гелеобразования

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПВП – поливинилпирролидон

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПС – полисахариды

ХТЗ – хитозан

АН – альгинат натрия

ФДИ – фотодинамическая инактивация

ТРП – триптофан

ДРС – динамическое рассеяние света

АСМ – атомно-силовая микроскопия

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grzybowski A. and Turczynowska M. More Antisepsis, Less Antibiotics Whenever Possible // *Asia-Pac J Ophthalmol.* – 2018. – V.7. – P. 72 – 75;
2. Alves E., Faustino M. A., Neves M. G., Cunha A., Tome J. and A. Almeida An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation // *Future Medicinal Chemistry.* – 2014. – V. 6, № 2. – P. 141 – 164;
3. Maisch T., Baier J., Franz B., Maier M., Landthaler M., Szeimies R. M. and Baumler W. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2007. – V. 27, № 3. – P. 7223 – 7228;
4. Jia Q., Song Q., Li P. and Huang W. Rejuvenated Photodynamic Therapy for Bacterial Infections // *Adv. Healthcare Mater.* – 2019. – V. 8, № 14. – P. 1 – 19;
5. Кустов А. В., Березин Д. Б., Стрельников А. И., Лапочкина Н. П. Противоопухолевая и антимикробная фотодинамическая терапия: механизмы, мишени, клиничко-лабораторные исследования: руководство / под научной редакцией профессора А. К. Гагуа. – Москва: Ларго, 2020. – 108 с;
6. Shen T., Zhao Z-G., Yu Q. and Xu H-J. Photosensitized reduction of benzyl by heteroatom-containing anthracene dyes // *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry.* – 1989. – V.47. – P. 203 – 212;
7. Tardivo J. P., Del Giglio A., de Oliveira C. S., Gabrielli D. S., Junqueira H. C., Tada D. B., Severino D., Turchiello R. de F., Baptista M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* – 2005. – V. 2. – P. 175 – 191;
8. Demartis S., Obinu A., Gavini E., Giunchedi P., Rassu G. Nanotechnology-based rose Bengal: A broad-spectrum biomedical tool // *Dyes and Pigments.* – 2021. – V.188. – 109236;
9. Горох Ю. А., Аксенова Н. А., Соловьева А. Б., Ольшевская В. А., Зайцев А. В., Лагутина М. А., Лузгина В. Н., Миронов А. Ф., Калинин В. Н. Влияние амфифильных полимеров на фотокаталитическую активность

- водорастворимых порфириновых фотосенсибилизаторов // Журнал физической химии. – 2011. – Т. 85, № 5. – С. 1 – 5;
10. Solovieva A. B., Tolstih P. I., Melik-Nubarov N. S., Zhientaev T. M., Kuleshov I. G., Glagolev N. N., Ivanov A. V., Karahanov G. I., Tolstih M. P. and Timashev P. S. Combined laser and photodynamic treatment in extensive purulent wounds // *Laser Phys.* – 2010. – V. 20, № 5. – P. 1068 – 1073;
  11. 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;
  12. Миронов А. Ф., Жданова К. А., Брагина Н. А. Наноразмерные средства доставки фотосенсибилизаторов для диагностики и фотодинамической терапии в онкологии // *Успехи химии.* – 2018. – Т. 87, вып. 9. – С. 859 – 881;
  13. Neo Y., Lee H. J., Kim E. H., Kim M. K., Ito Y., Son T. I. Regeneration effect of visible light-curing furfuryl alginate compound by release of epidermal growth factor for wound healing application // *J Appl Polym Sci.* – 2014. – V. 131, № 14. – 40113.
  14. Филоненко Е. В. История развития флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии и их возможности в онкологии // *Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева.* – 2013. – Т. LVII, № 2. – С. 1 – 11;
  15. Castano A. P., Demidova T. N. and Hamblin M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* – 2004. – V. 1, № 4. – P. 279 – 293;
  16. Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B. W., Jori G., Kessel D., Korbek M., Moan J., Peng Q. Photodynamic Therapy. Review // *JNCI Journal of the National Cancer Institute.* – 1998. – V. 90, № 12. – P. 889 – 905;
  17. Brown S. B., Brown E. A. and Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment // *The Lancet Oncology.* – 2004. – V. 5, № 8. – P. 497 – 508;

18. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 1997. – V. 39, № 1. – P. 1 – 18;
19. Слесаревская М. Н., Соколов А. В. Фотодинамическая терапия: основные принципы и механизмы действия // *Урологические ведомости*. – 2012. – Т. II, № 3. – С. 24 – 28;
20. Triesscheijn M., Baas P., Schellens J. H. M., Stewart F. A. Photodynamic Therapy in Oncology // *The Oncologist*. – 2006. – V. 11, № 9. – P. 1033 – 1044;
21. Тучина Е. С. Некоторые аспекты антимикробного фотодинамического действия // *Известия Саратовского университета*. – 2022. – Т. 22, вып. 1. – С. 33 – 46.
22. Толстых П. И., Соловьева А. Б., Тамразова О. Б., Аксенова Н. А., Кулешов И. Ю., Сорокатый А. А. Современные аспекты фотодинамической терапии гнойных и хронических ран фотодитазином, комплексированным с амфифильными полимерами Обзор литературы // *Московский хирургический журнал*. – 2011. – № 3 (19). – С. 69 – 72;
23. Странадко Е. Ф., Кулешов И. Ю., Караханов Г. И. Фотодинамическое воздействие на патогенные микроорганизмы (Современное состояние проблемы антимикробной фотодинамической терапии) // *Лазерная медицина*. – 2010. – Т. 14, № 2. – С. 52 – 56;
24. Youf R., Müller M., Balasini A., Thétiot F., Müller M., Hascoët A., Jonas U., Schönherr H., Lemercier G., Montier T. and Le Gall T. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies // *Pharmaceutics*. – 2021. – V. 13, № 12. – 1995;
25. Функциональные материалы на основе тетрапиррольных макрогетероциклических соединений / Под ред. О. И. Койфмана. – М.: ЛЕНАНД. – 2019. – 848 с;
26. Hamblin M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes // *Current Opinion in Microbiology*. – 2016. – V. 33. – P. 67 – 73;

27. Klausen M., Ucuncu M. and Bradley M. Design of Photosensitizing Agents for Targeted Antimicrobial Photodynamic Therapy // *Molecules*. – 2020. – V. 25. – 5239;
28. Costa L., Faustino M. A. F., Neves M. G. P. M. S., Cunha Â. and Almeida A. Photodynamic Inactivation of Mammalian Viruses and Bacteriophages // *Viruses*. – 2012. – V. 4, № 7. – P. 1034 – 1074;
29. Hirose M., Yoshida Y., Horii K., Hasegawa Y., Shibuya Y. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy with Rose Bengal and blue light against cariogenic bacteria // *Archives of Oral Biology*. – 2021. – V. 122. – 105024;
30. Seeger M. G., Ries A. S., Gressler L. T., Botton S. A., Iglesias B. A., Cargnelutti J. F. In vitro antimicrobial photodynamic therapy using tetra-cationic porphyrins against multidrug-resistant bacteria isolated from canine otitis // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2020. – V. 32. – 101982;
31. Толстых П. И., Дербенев В. А., Кулешов И. Ю., Азимшоев А. М., Тамразова О. Б., Романова А. С., Караханов Т. И., Соловьева А. Б. Лазерная фотодинамическая терапия гнойных ран с фотосенсибилизатором хлоринового ряда // *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. – 2010. – № 12. – С. 17 – 22;
32. 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.
33. Гельфонд М. Л. Фотодинамическая терапия в онкологии // *Практическая онкология*. – 2007. – Т. 8, № 4. – С. 204 – 210;
  34. Henderson B. W. and Dougherty T. J. HOW DOES PHOTODYNAMIC THERAPY WORK? // *Photochem Photobiol*. – 1992. – V. 55, № 1. – P. 145 – 157.
  35. Pucelik B., Sułek A., Dąbrowski J. M. Bacteriochlorins and their metal complexes as NIR-absorbing photosensitizers: properties, mechanisms, and applications // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2020. – V. 416. – 213340.
  36. Курьянова А. С., Соловьева А. Б., Глаголев Н. Н., Аксенова Н. А., Тимашев П. С. Влияние длины волны и интенсивности возбуждающего света на эффективность фотогенерации синглетного кислорода фотодитазином в присутствии плуроника F-127 в модельных процессах фотоокисления // *Журнал физической химии*. – 2021. – Т. 95, № 6. – С. 939 – 946;
  37. Красновский А. А. мл. Первичные механизмы фотоактивации молекулярного кислорода. История развития и современное состояние исследований // *Биохимия*. – 2007. – т. 72, вып. 10. – С. 1311 – 1331;
  38. Agostinis P., Berg K., Cengel K. A., Foster T. H., Girotti A. W., Gollnick S.O., Hahn S. M., Hamblin M. R. et al. Photodynamic therapy of cancer: An update // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. – 2011. – V. 61, № 4. – P. 250 – 281;
  39. Ormond A. B. and Freeman H. S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy // *Materials* – 2013. – V. 6, № 3. – P. 817 – 840;
  40. Порфирины: структура, свойства, синтез / К.А. Аскарлов, Б.Д. Березин, Р.П. Евстигнеева и др. – М.: Наука, 1985. – 333 с;
  41. Dougherty T. J., Cooper M. T. and Mang T. S. Cutaneous phototoxic occurrences in patients receiving Photofrin® // *Lasers Surg. Med*. – 1990. – V. 10, № 5. – P. 485 – 488;
  42. Park Y. K., Park C. H. Clinical efficacy of photodynamic therapy // *Obstet Gynecol Sci*. – 2016. – V. 59, № 6. – P. 479 – 488;

43. Eljamel M. S., Goodman C., Moseley H. ALA and Photofrin® Fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre Phase III randomised controlled trial // *Lasers Med Sci.* – 2008. – V. 23, № 4. – P. 361 – 367;
44. Mang T. S., Mikulski L., Hall R. E. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* – 2010. – V. 7, № 2. – P. 98 – 105;
45. Solov'eva A. B., Kur'yanova A. S., Savko M. A., Aksenova N. A., Afanas'evskaya E. V., Zolottsev V. A., Taratynova M. O., Ponomarev G. V. and Timashev P. S. Photosensitizing Activity of Steroid Derivatives of Pyropheophorbide in the Oxidation of Tryptophan in the Aqueous Phase // *J of Phys. Chem.* – 2018. – V. 92, № 9. – P. 1830 – 1836;
46. Longo J. P. F., Leal S. C., Simioni A. R., de Fátima Menezes Almeida-Santos M., Tedesco A. C., Azevedo R. B. Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study // *Lasers Med Sci.* – 2012. – V. 104, № 17. – P. 575 – 584;
47. Calzavara-Pinton P. G., Venturini M., Capezzer R., Sala R., Zane C. Photodynamic therapy of interdigital mycoses of the feet with topical application of 5-aminolevulinic acid // *Photoderm Photoimm Photomed.* – 2004. – V. 20, № 3. – P. 144 – 147;
48. Jendželovská Z., Jendželovský R., Kuchárová B. and Fedoročko P. Hypericin in the Light and in the Dark: Two Sides of the Same Coin // *Front. Plant Sci.* – 2016. – V. 7 – 560;
49. Araújo N. C., Fontana C. R., Gerbi M. E. M. and Bagnato V. S. Overall-Mouth Disinfection by Photodynamic Therapy Using Curcumin // *Photomedicine and Laser Surgery.* – 2012. – V. 30, № 2. – P. 96 – 101;
50. Usacheva M. N., Teichert M. C. and Biel M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and

- gram-negative microorganisms // *Lasers Surg Med.* – 2001. – V. 29, № 2. – P. 165 – 173;
51. Er Karaoğlu G., Uğuryıldın Z., Erdönmez D., Göl C., Durmuş M. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy administered using methylene blue, toluidine blue and tetra 2-mercaptopyridine substituted zinc phthalocyanine in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis* // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* – 2020. – V. 32. – 102038;
  52. Demidova T. N. and Hamblin M. R. Photodynamic Therapy Targeted to Pathogens // *Int J Immunopathol Pharmacol.* – 2004. – V. 17, № 3. – P. 245 – 254;
  53. Shrestha A. and Kishen A. Polycationic Chitosan-Conjugated Photosensitizer for Antibacterial Photodynamic Therapy // *Photochemistry and Photobiology.* – 2012. – V. 88, № 3. – P. 577 – 583;
  54. Berezin D. B., Kustov A. V., Krestyaninov M. A., Shukhto O. V., Batov D. V., Kukushkina N. V. The behavior of monocationic chlorin in water and aqueous solutions of non-ionic surfactant tween 80 and potassium iodide // *Journal of Molecular Liquids.* – 2019. – V. 283, № 1. – P. 532 – 536;
  55. Kustov A. V., Morshnev P. K., Kukushkina N. V., Smirnova N. L., Berezin D. B., Karimov D. R., Shukhto O. V., Kustova T. V., Belykh D. V., Mal'shakova M. V., Zorin V. P. and Zorina T. E. Solvation, cancer cell photoinactivation and the interaction of chlorin photosensitizers with a potential passive carrier non-ionic surfactant tween 80 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V.23. – 5294;
  56. Neckers D. C. Rose Bengal // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* – 1989. – V.47, № 1. – P. 1 – 29;
  57. Bettanin F., de Carvalho Fontinelles T. A., Maciel C. D., Dias L. G., Coutinho-Neto M. D., Homem-de-Mello P. Aggregation of photosensitizers: the role of dispersion and solvation on dimer formation energetics // *Theor Chem Acc.* – 2015. – V.134, № 12. – 152;
  58. Shrestha A., Hamblin M. R., Kishen A. Photoactivated rose bengal functionalized chitosan nanoparticles produce antibacterial/biofilm activity and stabilize dentin-

- collagen // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2014. – V.10, № 3. – P. 491 – 501;
59. Li R., Yuan L., Jia W., Qin M., Wang Y. Effects of Rose Bengal- and Methylene Blue-Mediated Potassium Iodide-Potentiated Photodynamic Therapy on *Enterococcus faecalis*: A Comparative Study // *Lasers Surg Med*. – 2021. – V.53, № 3. – P. 400 – 410;
60. Wen X., Zhang X., Szewczyk G., El-Hussein A., Huang Y. Y., Sarna T., Hamblin M. R. Potassium Iodide Potentiates Antimicrobial Photodynamic Inactivation Mediated by Rose Bengal in *In Vitro* and *In Vivo* Studies // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2017. – V.61, № 7. – e00467 – 17;
61. Chang C.-C., Yang Y.-T., Yang J.-C., Wu H.-D., Tsai T. Absorption and emission spectral shifts of rose bengal associated with DMPC liposomes // *Dyes and Pigments*. – 2008. – V.79, № 2. – P. 170 – 175;
62. Xu D. and Neckers D. C. Aggregation of rose bengal molecules in solution // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 1987. – V.40, № 2 – 3. – P. 361 – 370;
63. Rauf M. A., Graham J. P., Bukallah S. B., Al-Saedi M. A. S. Solvatochromic behavior on the absorption and fluorescence spectra of Rose Bengal dye in various solvents // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2009. – V.72, № 1. – P. 133 – 137;
64. Слюсарева Е. А. Фотоника флуороновых красителей в гомогенных и гетерогенных биополимерных средах: дисс. док. физ.-мат. наук: 01.04.05 / Слюсарева Евгения Алексеевна. – К., 2014. – 230 с;
65. Batistela V. R., Pellosi D. S., de Souza F. D., da Costa W. F., de Oliveira Santin S. M., de Souza V. R., Caetano W., de Oliveira H. P. M., Scarminio I. S., Hioka N. pKa determinations of xanthene derivatives in aqueous solutions by multivariate analysis applied to UV–Vis spectrophotometric data // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2011. – V.79, № 5. – P. 889 – 897;

66. Amat-Guerri F., López-González M. M. C., Sastre R. and the late Martínez-Utrilla R. Spectrophotometric determination of ionization and isomerization constants of Rose Bengal, eosin Y and some derivatives // *Dyes and Pigments*. – 1990. – V. 13, № 3. – P. 219 – 232;
67. Martin M. M., Lindqvist L. The pH dependence of fluorescein fluorescence // *Journal of Luminescence*. – 1975. – V. 10, № 6. – P. 381 – 390;
68. Bilski P., Dabestani R., Chignell C. F. Influence of cationic surfactant on the photoprocesses of eosine and rose bengal in aqueous solution // *J. Phys. Chem.* – 1991. – V. 95, № 15. – P. 5784 – 5791;
69. Мчедлов-Петросян Н. О. Флуоресцентные красители в растворах – хорошо изученные системы? // *Вестник Харьковского национального университета*. – 2004. – № 626. – С. 221 – 312;
70. Шелковский В. С. Использование окислительно-восстановительных и агрегационных свойств красителя метиленового синего в нанобиофизических исследованиях // *Биофизический вестник*. – 2015. – № 33 (1). – С. 5 – 29;
71. Salimi A., Roosta A. Experimental solubility and thermodynamic aspects of methylene blue in different solvents // *Thermochimica Acta*. – 2019. – V.675. – P. 134 – 139;
72. Chang T. W. Eczema herpeticum: Treatment with Methylene Blue and Light // *Arch Dermatol*. – 1975. – V. 111, № 9. – P. 1174 – 1175;
73. Lotufo M. A., Tempestini Horliana A. C. R., Santana T., de Queiroz A. C., Gomes A. O., Motta L. J., Ferrari R. A. M., dos Santos Fernandes K. P., Bussadori S. K. Efficacy of photodynamic therapy on the treatment of herpes labialis: A systematic review // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2020. – V. 29. – 101536;
74. Каштанова М. С., Морозова Н. С., Асланова Д. Р. Фотодинамическая терапия с применением метиленового синего у детей с церебральным параличом // *Медико-фармацевтический журнал "Пульс"*. – 2021. – Т. 23, № 4. – С. 31 – 35.

75. Лапченко А. С., Кучеров А. Г., Ордер Р. Я., Лапченко А. А. Антимикробная противовоспалительная фотодинамическая и светодиодная фототерапия последствий огнестрельной и минно-взрывной травмы головы и шеи // Вестник оториноларингологии. – 2018. Т. 83, № 1. – С. 62 – 64;
76. Balata M. L., Andrade L. P. de, Santos D. B. N., Cavalcanti A. N., Tunes U da R., Ribeiro E. D. P., Bittencourt S. Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized-controlled clinical trial // J Appl Oral Sci. – 2013. – V. 21, № 2. – P. 208 – 214;
77. Cwalinski T., Polom W., Marano L., Roviello G., D'Angelo A., Cwalina N., Matuszewski M., Roviello F., Jaskiewicz J. and Polom K. Methylene Blue—Current Knowledge, Fluorescent Properties, and Its Future Use // JCM. – 2020. – V. 9, № 11. – 3538;
78. Darabpour E., Kashef N., Mashayekhan S. Chitosan nanoparticles enhance the efficiency of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation of bacterial biofilms: An in vitro study // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2016. – V. 14. – P. 211 – 217;
79. Alvarenga L. H., Gomes A. C., Carribeiro P., Godoy-Miranda B., Noschese G., Simões Ribeiro M. et al. Parameters for antimicrobial photodynamic therapy on periodontal pocket—Randomized clinical trial // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2019. – V. 27. – P. 132 – 136;
80. Selvam S., Sarkar I. Bile salt induced solubilization of methylene blue: Study on methylene blue fluorescence properties and molecular mechanics calculation // Journal of Pharmaceutical Analysis. – 2017. – V. 7, № 1. – P. 71 – 75;
81. Shah P., Kumari Jha S., Bhattarai A. Spectrophotometric study of the sodium dodecyl sulfate in the presence of methylene blue in the methanol–water mixed solvent system // Journal of Molecular Liquids. – 2021. – V. 340. – 117200;
82. Mahmood T., Anwer F., Mahmood I., Kishwar F., Wahab A. Solvatochromic effect of Methylene Blue in different solvents with different polarity // European academic research. – 2013. – V. I. – Is. 6. – P. 1100 – 1109;

83. Wiklund L., Basu S., Miculescu A., Wiklund P., Ronquist G., Sharma H. S. Neuro- and Cardioprotective Effects of Blockade of Nitric Oxide Action by Administration of Methylene Blue // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2007. – № 18. – 2366;
84. Наянова Е. В., Елипашева Е. В., Сергеев Г. М., Сергеева В. П. Редокс-свойства метиленового голубого как перспективного фотометрического реагента для определения галогенных окислителей // *Аналитика и контроль*. – 2015. – Т. 19, № 2. – С. 154 – 160;
85. Lee S. K., Mills A. Novel photochemistry of leuco-Methylene Blue // *Chem. Commun.* – 2003. – V. 1122, № 1. – P. 231 – 244;
86. Adamcikova L., Pavlikova K. and Sevcik P. The decay of methylene blue in alkaline solution // *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*. – 2000. – V. 69, № 1. – P. 91 – 94;
87. Fernández-Pérez A., Marbán G. Visible Light Spectroscopic Analysis of Methylene Blue in Water; What Comes after Dimer? // *ACS Omega*. – 2020. – V. 5, № 46. – P. 29801 – 29815;
88. Zhao Z. and Malinowski E. R. Window factor analysis of methylene blue in water // *J. Chemometrics*. – 1999. – V. 13, № 2. – P. 83 – 94;
89. Rohatgi-Murherjee K. K. Some aspects of dyes and self-aggregation phenomenon in solution // *Indian Journal of Chemistry*. – 1992. – V. 31A. – P. 500 – 511;
90. Patil K., Pawar R. and Talap P. Self-aggregation of Methylene Blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu<sub>4</sub>NBr and urea // *Phys Chem Chem Phys*. – 2000. – V. 2, № 19. – P. 4313 – 4317;
91. Maiti N. C., Mazumdar S. and Periasamy N. J- and H-Aggregates of Porphyrin–Surfactant Complexes: Time-Resolved Fluorescence and Other Spectroscopic Studies // *J. Phys. Chem. B*. – 1998. – V. 102, № 9. – P. 1528 – 1538;
92. Eisfeld A. and Briggs J. S. The J- and H-bands of organic dye aggregates // *Chemical Physics*. – 2006. – V. 324, № 2 – 3. – P. 376 – 384;

93. Alexandridis P. Amphiphilic copolymers and their applications // *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. – 1996. – V. 1, № 4. – P. 490 – 501;
94. Wang Y., Grayson S. M. Approaches for the preparation of non-linear amphiphilic polymers and their applications to drug delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2012. – V. 64, № 9. – P. 852 – 865;
95. Yu J., Qiu H., Yin S., Wang H. and Li Y. Polymeric Drug Delivery System Based on Pluronics for Cancer Treatment // *Molecules*. – 2021. – V. 26, № 12. – 3610;
96. Pec E. A., Wout Z. G. and Johnston T. P. Biological Activity of Urease Formulated in Poloxamer 407 after Intraperitoneal Injection in the Rat // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 1992. – V. 81, № 7. – P. 626 – 630;
97. Kabanov A. V., Lemieux P., Vinogradov S., Alakhov V. Pluronic® block copolymers: novel functional molecules for gene therapy // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2002. – V. 54, № 2. – P. 223 – 233;
98. Naharros-Molinero A., Caballo-González M. Á., de la Mata F. J. and García-Gallego S. Direct and Reverse Pluronic Micelles: Design and Characterization of Promising Drug Delivery Nanosystems // *Pharmaceutics*. – 2022. – V. 14, № 12. – 2628;
99. Alexandridis P., Alan Hatton T. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 1995. – V. 96, № 1 – 2. – P. 1 – 46;
100. Kozlov M. Yu., Melik-Nubarov N. S., Batrakova E. V. and Kabanov A. V. Relationship between Pluronic Block Copolymer Structure, Critical Micellization Concentration and Partitioning Coefficients of Low Molecular Mass Solutes // *Macromolecules*. – 2000. – V. 33, № 9. – P. 3305 – 3313;
101. Mortensen K., Brown W. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solution. The influence of relative block size // *Macromolecules*. – 1993. – V. 26, № 16. – P. 4128 – 4135;

102. Al-Saden A. A., Whateley T. L. and Florence A. T. Poloxamer association in aqueous solution // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 1982. – V. 90, № 2. – P. 303 – 309;
103. Jarak I., Varela C. L., Tavares da Silva E., Roleira F. F. M., Veiga F., Figueiras A. Pluronic-based nanovehicles: Recent advances in anticancer therapeutic applications // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – V. 206. – 112526;
104. Yang B., Guo C., Chen S., Ma J., Wang J., Liang X., Zheng L. and Liu H. Effect of Acid on the Aggregation of Poly(ethylene oxide)–Poly(propylene oxide)–Poly(ethylene oxide) Block Copolymers // *J. Phys. Chem. B*. – 2006. – V. 110, № 46. – P. 23068 – 23074;
105. Melik-Nubarov N. S., Pomaz O. O., Dorodnykh T. Yu., Badun G. A., Ksenofontov A. L., Schemchukova O. B., Arzhakov S. A. Interaction of tumor and normal blood cells with ethylene oxide and propylene oxide block copolymers // *FEBS Letters*. – 1999. – V. 446, № 1. – P. 194 – 198;
106. Budkina O. A., Demina T. V., Dorodnykh T. Yu., Melik-Nubarov N. S. and Grozdova I. D. Cytotoxicity of nonionic amphiphilic copolymers // *Polym. Sci. Ser. A*. – 2012. – V. 54, № 9. – P. 707 – 717;
107. Niemiec A. and Loh W. Interaction of Ethylene Oxide–Propylene Oxide Copolymers with Ionic Surfactants Studied by Calorimetry: Random versus Block Copolymers // *J. Phys. Chem. B*. – 2008. – V. 112, № 3. – P. 727 – 733;
108. Lane T., Krukonis V. Reduction in the toxicity of a component of an artificial blood substitute by supercritical fluid fractionation // *Transfusion*. – 1988. – V. 28, № 4. – P. 375 – 378;
109. Kerleta V., Andrlík I., Braunmüller S., Franke T., Wirth M. and Gabor F. Poloxamer 188 supplemented culture medium increases the vitality of Caco-2 cells after subcultivation and freeze/thaw cycles // *ALTEX*. – 2010. – V. 27, № 3. – P. 191 – 197;
110. Кирш. Ю. Э. Поли-N-винилпирролидон и другие поли-N-виниламид: Синтез и физико-химические свойства. – М.: Наука, 1998. – 252 с;

111. Awasthi R., Manchanda S., Das P., Velu V., Malipeddi H., Pabreja K., Pinto T. D. J.A., Gupta G. and Dua K. 9-Poly(vinylpyrrolidone). In: Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems. Elsevier, 2018. – P. 255 – 272;
112. Kurakula M., Rao G. S. N. K. Pharmaceutical assessment of polyvinylpyrrolidone (PVP): As excipient from conventional to controlled delivery systems with a spotlight on COVID-19 inhibition // Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2020. – V. 60. – 102046;
113. Nair B. Final Report On the Safety Assessment of Polyvinylpyrrolidone (PVP) // Int J Toxicol. – 1998. – V. 17, № 4. – P. 95 – 130;
114. Buhler V. Kollidon Polyvinylpyrrolidone excipients for the pharmaceutical industry / BASF SE The Chemical Company, 2008. – 328 p;
115. Haaf F., Sanner A. and Straub F. Polymers of N-Vinylpyrrolidone: Synthesis, Characterization and Uses // Polym J. – 1985. – V. 17, № 1. – P. 143 – 152.
116. Suberlyak O. and Skorokhoda V. Hydrogels Based on Polyvinylpyrrolidone Copolymers. in Hydrogels. Haider S. and Haider A. editors., InTech, 2018. – 210 p;
117. Molyneux P. and Frank H. P. The Interaction of Polyvinylpyrrolidone with Aromatic Compounds in Aqueous Solution. Part I. Thermodynamics of the Binding Equilibria and Interaction Forces 1 // J. Am. Chem. Soc. – 1961. – V. 83, № 15. – P. 3169 – 3174;
118. Süvegh K. and Zelkó R. Physical Aging of Poly(vinylpyrrolidone) under Different Humidity Conditions // Macromolecules. – 2002. – V. 35, № 3. – P. 795 – 800;
119. Goldfarb J. and Rodriguez S. Aqueous Solutions of Polyvinylpyrrolidone // Die Makromolekulare Chemie. – 1968. – V. 16, № 2760. – P. 96 – 106;
120. Кузнецов В. А., Папинова А. В., Кущев П. О., Шатал Г. В. Самоорганизующиеся системы поли-N-винилпирролидон-сульфанола в разбавленных водных растворах // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2015. – № 1. – С. 10 – 15;

121. Maruthamuthu M. and Sobhana M. Hydrophobic interactions in the binding of polyvinylpyrrolidone // *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* – 1979. – V. 17, № 10. – P. 3159 – 3167;
122. Luo Y., Hong Y., Shen L., Wu F. and Lin X. Multifunctional Role of Polyvinylpyrrolidone in Pharmaceutical Formulations // *AAPS PharmSciTech.* – 2021. – V. 22, № 1. – 34;
123. Verma U., Naik J. B., Patil J. S., Yadava S. K. Screening of process variables to enhance the solubility of famotidine with 2-HydroxyPropyl- $\beta$ -Cyclodextrin & PVP K-30 by using Plackett–Burman design approach // *Materials Science and Engineering: C.* – 2017. – V. 77. – P. 282 – 292;
124. El Afeni A., Guettari M., Tajouri T. Effect of polymer conformation on polymer-surfactant interaction in salt-free water // *Colloid Polym Sci.* – 2016. – V. 294, № 7. – P. 1097 – 1106;
125. Higa O. Z., Rogero S. O., Machado L. D. B., Mathor M. B., Lugão A. B. Biocompatibility study for PVP wound dressing obtained in different conditions // *Radiation Physics and Chemistry.* – 1999. – V. 55, № 5–6. – P. 705 – 707;
126. Angervall L. and Berntsson S. Oral toxicity of polyvinyl pyrrolidone products of low average molecular weight // *Journal of the Institute of Brewing.* – 1961. – V. 67, № 4. – P. 335 – 336;
127. Jang H.-J., Shin C. Y. and Kim K.-B. Safety Evaluation of Polyethylene Glycol (PEG) Compounds for Cosmetic Use // *Toxicological Research.* – 2015. – V. 31, № 2. – P. 105 – 136;
128. Greenwald R. B. PEG drugs: an overview // *Journal of Controlled Release.* – 2001. – V. 74, № 1 – 3. – P. 159 – 171;
129. D'souza A. A. and Shegokar R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications // *Expert Opinion on Drug Delivery.* – 2016. – V. 13, № 9. – P. 1257 – 1275;
130. Wu J. and Chen S. Investigation of the Hydration of Nonfouling Material Poly(ethylene glycol) by Low-Field Nuclear Magnetic Resonance // *Langmuir.* – 2012. – V. 28, № 4. – P. 2137 – 2144;

131. Huang L., Nishinari K. Interaction between poly(ethylene glycol) and water as studied by differential scanning calorimetry // *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* – 2001. – V. 39, № 5. – P. 496 – 506;
132. Аббасов Х. Ф. Конформационные характеристики макромолекул полиэтиленгликолей в водных растворах по данным рефрактометрии // *Журнал физической химии.* – 2014. – Т. 88, № 6. – С. 979 – 982;
133. Badi N. Non-linear PEG-based thermoresponsive polymer systems // *Progress in Polymer Science.* – 2017. – V. 66. – P. 54 – 79;
134. Veronese F. M. and Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery // *Drug Discovery Today.* – 2005. – V. 10, № 21. – P. 1451 – 1458;
135. Van Steenis J. H., Van Maarseveen E. M., Verbaan F. J., Verrijck R., Crommelin D. J. A., Storm G., Hennink W. E. Preparation and characterization of folate-targeted pEG-coated pDMAEMA-based polyplexes // *Journal of Controlled Release.* – 2003. – V. 87, № 1 – 3. – P. 167 – 176;
136. Suk J. S., Xu Q., Kim N., Hanes J., Ensign L. M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2016. – V. 99. – P. 28 – 51;
137. Fishburn C. S. The Pharmacology of PEGylation: Balancing PD with PK to Generate Novel Therapeutics // *Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2008. – V. 97, № 10. – P. 4167 – 4183;
138. Hong R., Fischer N. O., Emrick T. and Rotello V. M. Surface PEGylation and Ligand Exchange Chemistry of FePt Nanoparticles for Biological Applications // *Chem Mater.* – 2005. – V. 17, № 18. – P. 4617 – 4621;
139. Panico A., Serio F., Bagordo F., Grassi T., Idolo A., De Giorgi M., Guido M., Congedo M., De Donno A. Skin Safety and Health Prevention: an Overview of Chemicals in Cosmetic Products // *Journal of Preventive Medicine and Hygiene.* – 2019. – V. 60. – P. E50 – E57;
140. Partain E. M. Chapter - Industrially important polysaccharides, in book: *Applied Polymer Science: 21st Century.* Elsevier, 2000. – P. 303 – 323;

141. Yu Y., Shen M., Song Q., Xie J. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review // *Carbohydrate Polymers*. – 2018. – V. 183. – P. 91 – 101;
142. Zafar R., Zia K. M., Tabasum S., Jabeen F., Noreen A., Zuber M. Polysaccharide based bionanocomposites, properties and applications: A review // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2016. – V. 92. – P. 1012 – 1024;
143. Dai T., Tanaka M., Huang Y.-Y. and Hamblin M. R. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects // *Expert Review of Anti-infective Therapy*. – 2011. – V. 9, № 7. – P. 857 – 879;
144. Aranaz I., Alcántara A. R., Civera M. C., Arias C., Elorza B., Heras Caballero A., Acosta N. Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications // *Polymers*. – 2021. – V. 13, № 19. – 3256;
145. Younes I. and Rinaudo M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications // *Marine Drugs*. – 2015. – V. 13, № 3. – P. 1133 – 1174;
146. Rinaudo M., Pavlov G., Desbrières J. Solubilization of Chitosan in Strong Acid Medium // *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. – 1999. – V. 5, № 3. – P. 267 – 276;
147. Pillai C. K. S., Paul W., Sharma C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation // *Progress in Polymer Science*. – 2009. – V. 34, № 7. – P. 641 – 678;
148. Давыдова В. Н., Ермак И. М. Конформация молекул хитозана в водных растворах // *Биофизика*. – 2018. – Т. 63, вып. 3. – С. 648 – 660;
149. Новиков В. Ю., Коновалова И. Н., Кучина Ю. А., Долгопятова Н. В., Черкун Ю. А. Гидратационный механизм гетерогенного щелочного деацетилирования хитина // *Вестник МГТУ*. – 2017. – Т. 20, № 3. – С. 515 – 525;
150. Blagodatskikh I. V., Bezrodnykh E. A., Abramchuk S. S., Muranov A. V., Sinitsyna O. V., Khokhlov A. R., Tikhonov V. E. Short chain chitosan solutions:

- self-assembly and aggregates disruption effects // *J Polym Res.* – 2013. – V. 20, № 2. – 73;
151. Bakshi P. S., Selvakumar D., Kadirvelu K. and Kumar N. S. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2020. – V. 150. – P. 1072 – 1083;
152. Philippova O. E., Volkov E. V., Sitnikova N. L., Khokhlov A. R., Desbrieres J., Rinaudo M. Two Types of Hydrophobic Aggregates in Aqueous Solutions of Chitosan and Its Hydrophobic Derivative // *Biomacromolecules.* – 2001. – V. 2, № 2. – P. 483 – 490;
153. Li P., Dai Y.-N., Zhang J.-P., Wang A.-Q., Wei Q. Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine // *Int J Biomed Sci.* – 2008. – V. 4, № 3. – P. 221 – 228;
154. Vinsova J. and Vavrikova E. Recent Advances in Drugs and Prodrugs Design of Chitosa // *CPD.* – 2008. – V. 14, № 13. – P. 1311 – 1326;
155. Ardean C., Davidescu C. M., Nemeş N. S., Negrea A., Ciopec M., Duteanu N., Negrea P., Duda-Seiman D. and Musta V. Factors Influencing the Antibacterial Activity of Chitosan and Chitosan Modified by Functionalization // *IJMS.* – 2021. – V. 22, № 14. – 7449;
156. Chirkov S. N. The Antiviral Activity of Chitosan (Review) // *Applied Biochemistry and Microbiology.* – 2002. – V. 38, № 1. – P. 1 – 8;
157. Няникова Г. Г., Маметнабиев Т. Э., Калинин И. П., Гепецкая М. В., Комиссарчик С. М., Елдинова Е. Ю. Области применения хитозана // *Известия СПбГТИ.* – 2007. – № 2 – С. 20 – 26;
158. Rodrigues Pereira J., Suassuna Bezerra G., Alves Furtado A., De Carvalho T. G., Costa Da Silva V., Lins Bispo Monteiro A. et al. Chitosan Film Containing *Mansoa hirsuta* Fraction for Wound Healing // *Pharmaceutics.* – 2020. – V. 12, № 6. – 484;

159. Khan T. A., Peh K. K. and Ch'ng H. S. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing // *J Pharm Pharm Sci.* – 2000. – V. 3, № 3. – P. 303 – 311;
160. Alemdaroğlu C., Değim Z., Çelebi N., Zor F., Öztürk S., Erdoğan D. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor // *Burns.* – 2006. – V. 32, № 3. – P. 319 – 327;
161. Millner R. W. J., Lockhart A. S., Bird H., Alexiou C. A New Hemostatic Agent: Initial Life-Saving Experience With Celox (Chitosan) in Cardiothoracic Surgery // *The Annals of Thoracic Surgery.* – 2009. – V. 87, № 2. – P. e13 – e14;
162. Devlin J. J., Kircher S., Kozen B. G., Littlejohn L. F. and Johnson A. S. Comparison of ChitoFlex®, CELOXTM, and QuikClot® in Control of Hemorrhage // *The Journal of Emergency Medicine.* – 2011. – V. 41, № 3. – P. 237 – 245.
163. Feng P., Luo Y., Ke C., Qiu H., Wang W., Zhu Y., Hou R., Xu L. and Wu S. Chitosan-Based Functional Materials for Skin Wound Repair: Mechanisms and Applications // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2021. – V. 9. – 650598;
164. Wang B., Wan Y., Zheng Y., Lee X., Liu T., Yu Z., Huang J., Sik Ok Y., Chan J. and Gao B. Alginate-based composites for environmental applications: a critical review // *Critical Reviews in Environmental Science and Technology.* – 2019. – V. 49, № 4. – P. 318 – 356;
165. Lee K. Y., Mooney D. J. Alginate: Properties and biomedical applications // *Progress in Polymer Science.* – 2012. – V. 37, № 1. – P. 106 – 126;
166. Torres M. R., Sousa A. P. A., Silva Filho E. A. T., Melo D. F., Feitosa J. P. A., De Paula R. C. M. and Lima M. G. S. Extraction and physicochemical characterization of *Sargassum vulgare* alginate from Brazil // *Carbohydrate Research.* – 2007. – V. 342, № 14. – P. 2067 – 2074;
167. Jiménez-Escrig A. and Sánchez-Muniz F. J. Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism // *Nutrition Research.* – 2000. – V. 20, № 4. – P. 585 – 598;

168. Szekalska M., Puciłowska A., Szymańska E., Ciosek P. and Winnicka K. Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications // *International Journal of Polymer Science*. – 2016. – V. 2016. – P. 1 – 17;
169. Sellimi S., Younes I., Ayed H. B., Maalej H., Montero V., Rinaudo M., Dahia M., Mechichi T., Hajji M. and Nasri M. Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolated from a Tunisian brown seaweed // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2015. – V. 72. – P. 1358 – 1367;
170. Guo X., Wang Y., Qin Y., Shen P., Peng Q. Structures, properties and application of alginic acid: A review // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – V. 162. – P. 618 – 628;
171. Hay I. D., Rehman Z. U., Moradali M. F., Wang Y. and Rehm B. H. A. Microbial alginate production, modification and its applications // *Microbial Biotechnology*. – 2013. – V. 6, № 6. – P. 637 – 650;
172. Wong T. Y., Preston L. A. and Schiller N. L. Alginate Lyase: Review of Major Sources and Enzyme Characteristics, Structure-Function Analysis, Biological Roles, and Applications // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2000. – V. 54, № 1. – P. 289 – 340;
173. Panikkar R. and Brasch D. J. Composition and block structure of alginates from New Zealand brown seaweeds // *Carbohydrate Research*. – 1996. – V. 293, № 1. – P. 119 – 132;
174. Draget K. I., Skjåk Bræk G. and Smidsrød O. Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight // *Carbohydrate Polymers*. – 1994. – V. 25, № 1. – P. 31 – 38;
175. Ching S. H., Bansal N. and Bhandari B. Alginate gel particles – A review of production techniques and physical properties // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017. – V. 57, № 6. – P. 1133 – 1152;
176. Sun J. and Tan H. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications // *Materials*. – 2013. – V. 6, № 4. – P. 1285 – 1309;

177. Solah V. A., Kerr D. A., Adikara C. D., Meng X., Binns C. W., Zhu K., Devine A., Prince R. L. Differences in satiety effects of alginate- and whey protein-based foods // *Appetite*. – 2010. – V. 54, № 3. – P. 485 – 491;
178. Varaprasad K., Jayaramudu T., Kanikireddy V., Toro C., Sadiku E. R. Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review // *Carbohydrate Polymers*. – 2020. – V. 236. – 116025;
179. Cui R., Zhang L., Ou R., Xu Y., Xu L., Zhan X. Y., Li D. Polysaccharide-Based Hydrogels for Wound Dressing: Design Considerations and Clinical Applications // *Front Bioeng Biotechnol*. – 2022. – V. 10. – 845735;
180. Sohn E. J., Ahn H. B., Roh M. S., Ryu W. Y. and Kwon Y. H. Efficacy of Temperature-Sensitive Guardix-SG for Adhesiolysis in Experimentally Induced Eyelid Adhesion in Rabbits // *Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery*. – 2013. – V. 29, № 6. – P. 458 – 463;
181. Hooper S. J., Percival S. L., Hill K. E., Thomas D. W., Hayes A. J., Williams D. W. The visualisation and speed of kill of wound isolates on a silver alginate dressing // *International Wound Journal*. – 2012. – V. 9, № 6. – P. 633 – 642;
182. Koga A. Y., Felix J. C., Silvestre R. G. M., Lipinski L. C., Carletto B., Kawahara F. A., Pereira A. V. Evaluation of wound healing effect of alginate film containing Aloe vera gel and cross-linked with zinc chloride // *Acta Cir. Bras*. – 2020. – V. 35, № 5. – e202000507;
183. Solovieva A. B., Rudenko T. G., Shekhter A. B., Glagolev N. N., Spokoinyi A. L., Fayzullin A. L., Aksenova N. A., Shpichka A. I., Kardumyan V. V. and Timashev P. S. Broad-spectrum antibacterial and pro-regenerative effects of photoactivated Photodithazine-Pluronic F127-Chitosan polymer system: In vivo study // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2020. – V. 210. – 111954;
184. Solovieva A. B., Kardumyan V. V., Aksenova N. A., Belovolova L. V., Glushkov M. V., Bezrukov E. A., Sukhanov R. B., Kotova S. L. and Timashev P. S. Optimization of Photosensitized Tryptophan Oxidation in the Presence of

- Dimegin-Polyvinylpyrrolidone-Chitosan Systems // *Sci Rep.* – 2018. – V. 8, № 1. – 8042;
185. Rudenko T. G., Shekhter A. B., Guller A. E., Aksenova N. A., Glagolev N. N., Ivanov A. V., Aboyants R. K., Kotova S. L. and Solovieva A. B. Specific Features of Early Stage of the Wound Healing Process Occurring Against the Background of Photodynamic Therapy Using Fotoditazin Photosensitizer-Amphiphilic Polymer Complexes // *Photochem Photobiol.* – 2014. – V. 90, № 6. – P. 1413 – 1422;
186. Da Silva Souza Campanholi K., Combuca Da Silva Junior R., Cazelatto Da Silva I., Said Dos Santos R., Vecchi C. F., Bruschi M. L. et al. Stimulus-responsive phototherapeutic micellar platform of Rose Bengal B: A new perspective for the treatment of wounds // *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* – 2021. – V. 66. – 102739.
187. Soares J. C. M., Luiz M. T., Oshiro Junior J. A., Besegato J. F., De Melo P. B. G., Rastelli A. N. D. S., Chorilli M. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue-loaded polymeric micelles against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* biofilms // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* – 2023. – V. 41. – 103285.
188. Hakimov S., Kylychbekov S., Harness B., Neupane S., Hurley J., Brooks A., Banga S., Er A. O. Evaluation of silver nanoparticles attached to methylene blue as an antimicrobial agent and its cytotoxicity // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* – 2022. – V. 39. – 102904.
189. George S., Kishen A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection // *J. Biomed. Opt.* – 2007. – V. 12, № 3. – 034029.
190. Pellosi D. S., Estevão B. M., Semensato J., Severino D., Baptista M. S., Politi M. J., Hioka N., Caetano W. Photophysical properties and interactions of xanthene dyes in aqueous micelles // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* – 2012. – V. 247. – P. 8 – 15.

191. Atvars T. D. Z., Bortolato C. A. and Dibbern-Brunelli D. Electronic absorption and fluorescence spectra of xanthene dyes in polymers // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 1992. – V. 68, № 1. – P. 41 – 50;
192. Lipatova I. M., Makarova L. I. and Mezina E. A. A spectrophotometric study of the complexation between methylene blue dye and sodium alginate // *Russ J Gen Chem*. – 2016. – V. 86, № 9. – P. 2226 – 2231;
193. Пат. 2609735 РФ. Способ оптимизации фотодинамической терапии гнойных ран / Соловьева А. Б., Аксенова Н. А., Спокойный А. Л., Шехтер А. Б., Руденко Т. Г., Кардумян В.В., Берлин А. А., Брагина Н.А.; заявл. 09.12.2015; опубл. 02.02.2017;
194. Толстых П. И., Соловьева А. Б., Тамразова О. Б., Аксенова Н. А., Воротилов Ю. В. Оптимизация методов фотодинамической терапии ран фотодитазином, комплексированным с амфифильными полимерами // *Лазерная медицина*. – 2011. – Т. 15, вып. 5. – С. 55 – 58;
195. Соловьева А. Б., Аксенова Н. А., Глаголев Н. Н., Мелик-Нубаров Н. С., Иванов А. В., Волков В. И., Черняк А. В. Амфифильные полимеры в фотодинамической терапии // *Химическая физика*. – 2012 – Т. 31, № 6. – С. 72 – 80;
196. Ghiggino K. P., Brown J. M., Launikonis A., Mau A. W. H. and Sasse W. H. F. Photochemical and Photophysical Studies of Rose Bengal Poly(vinylpyrrolidone) — Application to the Photoreduction of Water // *Aust. J. Chem*. – 1988. – V. 41, № 1. – P. 9 – 18;
197. Mendes B., Kassumeh S., Aguirre-Soto A., Pei Q., Heyne B. and Kochevar I. E. Influence of Rose Bengal Dimerization on Photosensitization // *Photochemistry and Photobiology*. – 2021. – V. 97, № 4. – P. 718 – 726;
198. Курьянова А. С., Аксенова Н. А., Савко М. А., Глаголев Н. Н., Дубовик А. С., Плащина И. Г., Тимашев П. С., Соловьева А. Б. Влияние амфифильных полимеров на активность бенгальского розового в реакции фотоокисления

- триптофана в водной среде // Журнал физической химии. – 2022 – Т. 96, № 5. – С. 747 – 753;
199. Usacheva M. N., Teichert M. C., Biel M. A. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2003. – V. 71, № 1 – 3. – P. 87 – 98;
200. Karunanithi P., R V., Raj E. P., Rajesh P., Krishnamoorthy S., Dash S. Pluronic based neutral-ionic binary micellar surfactant systems for solubilizing the cationic methylene blue dye // Chemical Physics Impact. – 2022. – V. 5. – 100092;
201. Savko M. A., Aksenova N. A., Akishina A. K., Khasanova O. V., Glagoleva N. N., Rumyantseva V. D., Zhdanova K. A., Spokoinyi A. L. and Solov'eva A. B. Effect of Pluronic F-127 on the Photosensitizing Activity of Tetraphenylporphyrins in Organic and Aqueous Phases // Russian Journal of Physical Chemistry A. – 2017. – V. 91, № 11. – P. 2260 – 2267;
202. Zhiyentayev T. M., Boltaev U. T., Solov'eva A. B., Aksenova N. A., Glagolev N. N., Chernjak A. V. and Melik-Nubarov N. S. Complexes of Chlorin e6 with Pluronics and Polyvinylpyrrolidone: Structure and Photodynamic Activity in Cell Culture // Photochemistry and Photobiology. – 2014. – V. 90, № 1. – P. 171 – 182;
203. Aksenova N. A., Oles T., Sarna T., Glagolev N. N., Chernjak A. V., Volkov V. I., Kotova S. L., Melik-Nubarov N. S. and Solovieva A. B. Development of Novel Formulations for Photodynamic Therapy on the Basis of Amphiphilic Polymers and Porphyrin Photosensitizers. Porphyrin-Polymer Complexes in Model Photosensitized Processes // Laser Physics. – 2012. – V. 22, № 10. – P. 1642 – 1649.
204. Moczek L. and Nowakowska M. Novel Water-Soluble Photosensitizers from Chitosan // Biomacromolecules. – 2007. – V. 8, № 2. – P. 433 – 438;
205. Caykara T., Demirci S., Eroglu M., Guven O. Poly(ethylene oxide) and its blends with sodium alginate // Polymer. – 2022. – V. 4, № 12. – P. 8764 – 8773;

206. 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;
207. Власова И. М., Кулешова А. А., Власов А. А., Салецкий А. М. Поляризованная флуоресценция в исследованиях вращательной диффузии маркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина // *Вестник Московского университета*. – 2014 – серия 3, № 5. – С. 36 – 40;
208. Гвоздев Д. А. Фотосенсибилизирующие свойства гибридных комплексов фталоцианинов и флуоресцентных наночастиц: дисс. канд. биол. наук: 03.01.02 / Гвоздев Даниил Александрович. – М., 2019. – 148 с;
209. Кальвинковская Ю. А., Цаплев Ю. Б., Трофимов А. В., Романенко А. А., Бушук С. Б., Павич Т. А., Лапина В. А. Анизотропия и спектроскопические свойства комплексов молекул мезо-тетра(4-карбоксифенил)порфирина с алмазными наночастицами // *Оптика и спектроскопия*. – 2020 – Т. 128, вып. 9. – С. 1363 – 1368;
210. Selvam S. and Sarkar I. Bile salt induced solubilization of methylene blue: Study on methylene blue fluorescence properties and molecular mechanics calculation // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2017. – V. 7, № 1. – P. 71 – 75;
211. 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;
212. Аксенова Н. А., Тимофеева В. А., Роговина С. З., Тимашев П. С., Глаголев Н. Н., Соловьева А. Б. Особенности фотокаталитических свойств и структуры порфиринсодержащих систем на основе хитозана // *Высокомолекулярные соединения*. – 2010 – Т. 52, № 2. – С. 314 – 320;

213. Kotova S. L., Timofeeva V. A., Belkova G. V., Aksenova N. A., Solovieva A. B. Porphyrin effect on the surface morphology of amphiphilic polymers as observed by atomic force microscopy // *Micron*. – 2012. – V. 43. – P. 445 – 449.