

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Егорова Антона Романовича «ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СИНТЕЗА И ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ХИТИНА И ХИТОЗАНА», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.15. – Экология (химические науки)

Актуальность темы. Создание материалов на основе биополимеров в настоящее время является очень актуальным направлением исследований, так как предполагает внедрение технологий в рамках концепции «зелёной химии», основными принципами которой являются экологическая безопасность окружающей среды и рациональное использование возобновляемых природных источников сырья. Основой для подобных технологий часто выступают полисахариды хитин и хитозан, обладающие комплексом ценных свойств: биологической активностью, уникальными сорбционными и хелатирующими свойствами, высокой способностью к биodeградации и неисчерпаемой сырьевой базой. Полисахариды в последние годы привлекают значительное внимание из-за разнообразного применения в различных отраслях промышленности, от продуктов питания и фармацевтики до материаловедения и биотехнологий, так как материалы на их основе предлагают универсальные решения современных проблем в области продовольственной безопасности, здравоохранения, экологической устойчивости и производства энергии. Подход с использованием химической модификации биополимеров обеспечивает значительную гибкость в получении структур, которые невозможно или затруднительно синтезировать в живых системах, и служит эффективным методом решения прикладных задач в такой области как разработка и доставка лекарств. Наличие первичной аминогруппы в структуре хитозана обеспечивает как собственный бактериостатический эффект, так и возможности химической модификации полимера с целью поиска эффективных производных для замены существующих антибиотиков и каталитических систем, которые зачастую служат токсическими компонентами стоков и факторами неблагоприятного воздействия на живые организмы. Процессы переработки биополимеров и получения их производных сложны и многостадийны, а также сопровождаются большим количеством агрессивных стоков (щелочи, кислоты, органические растворители). Также биополимеры в большинстве случаев неспособны к плавлению без разложения, что делает невозможным их переработку в расплаве. Поэтому исследования по разработке методов синтеза новых эффективных структур на основе хитина и хитозана без использования токсичных растворителей, катализаторов и инициаторов химических процессов за счёт активации функциональных групп полимеров к химическому взаимодействию в ходе механической

(кавитационной) обработки в экологически чистом растворителе – воде, представляют несомненную научную и практическую актуальность.

Достоверность и новизна результатов диссертации. В представленной диссертационной работе изложены результаты синтеза новых селенсодержащих производных хитина и хитозана; синтеза систем пролонгированного высвобождения ципрофлоксацина; комплексного исследования физико-химических, каталитических и биологических свойств полученных производных; разработки их эффективных матричных форм (наночастиц); изучения взаимосвязи их структуры и антибактериальной активности. Полученные результаты обладают *научной новизной*, а также имеют *теоретическую и практическую значимость*. Автором установлена возможность интенсификации ультразвуком в водной среде взаимодействия хитина и хитозана с бромидом 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия и ДЦК-опосредованного взаимодействия хитозана с ципрофлоксацином без деструкции полисахаридной цепи при сокращении избытка алкилирующего реагента. Выбраны условия и разработаны методики синтеза вышеуказанных производных полисахаридов и наночастиц на их основе. Обнаружена высокая каталитическая активность наночастиц селенсодержащих производных – новых экологичных катализаторов в реакции окисления 1-фенилэтилового спирта в ацетофенон бромом. Выявлена высокая противомикробная активность в сочетании с низкой токсичностью селенсодержащих производных хитозана и наночастиц на их основе, которые могут служить альтернативой традиционным антибиотикам. Разработан подход к получению наночастиц на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан с хорошим профилем высвобождения антибиотика, их высокая антибактериальная активность в сочетании с низкой токсичностью (в том числе *in vivo*). Установленные в ходе работы закономерности будут способствовать развитию методов зелёной химии в химической модификации хитина и хитозана, которые могут быть использованы в том числе для создания новых высокоэффективных нетоксичных катализаторов, а также новых активных *in vivo* антибактериальных соединений.

При выполнении диссертационной работы автором использованы современные физико-химические методы анализа: ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, тонкослойная хроматография, УФ спектрометрия, элементный анализ, электронная и атомно-силовая микроскопия, динамическое светорассеяние; проведены микробиологические исследования. Используемые методы адекватны поставленным задачам, что свидетельствует о высокой квалификации соискателя.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Диссертация А.Р. Егорова изложена на 132

страницах, представлена в виде 4-х глав, состоящих из введения и литературного обзора, двух глав с изложением и обсуждением результатов проведенных исследований, экспериментальной части, в которой представлены исследуемые объекты и используемые в работе методики. В конце диссертации приведены основные результаты и выводы по работе, а также список использованной литературы, включающий 237 наименований.

Литературный обзор оставляет хорошее впечатление, прежде всего, определенной направленностью на обоснование выбора объектов исследования для решения поставленных задач, преследующих как методические цели, так и систематические фундаментальные исследования, направленные на развитие методов зеленой химии, основные принципы которой также обсуждены, и приведены данные о современном состоянии проблемы. В конце 1-ой главы дана общая характеристика представленной диссертационной работы, где сформулированы цели и задачи исследования в соответствии с проблемами, раскрытыми в литературном обзоре, сформулирована научная новизна полученных результатов и их практическая значимость.

Глава 2 посвящена синтезу новых водорастворимых селенсодержащих производных хитина и хитозана. В начале главы автором дан краткий анализ литературных данных, обосновывающий актуальность проведения эксперимента, целесообразность использования выбранных реагентов-модификаторов и методологии проведения синтеза. Автором убедительно доказано, что ультразвуковая обработка существенно сокращает время реакции и требуемый избыток реагента для достижения одной и той же степени замещения в сравнении с традиционным способом проведения реакции при умеренно повышенной температуре. Автором также установлено, что достигаемая конверсия функциональных групп хитозана в выбранных условиях проведения эксперимента не зависит от его исходной молекулярной массы (от 40 до 180 кДа). При проведении аналогичных процессов алкилирования хитина автором выбраны оптимальные параметры УЗ-воздействия (90 кГц, 250 Вт), в результате были синтезированы новые водорастворимые производные хитина с низкой (около 0.17), средней (около 0.40) и высокой (около 0.65) степенью замещения, которая так же не зависела от молекулярной массы исходного хитина (от 35 до 170 кДа). Автором показано, что обработка ультразвуком водных суспензий исходного хитина в выбранных условиях не приводит к деполимеризации или дезацетилированию полисахарида (90 кГц, 250 Вт, 30 минут). Строение полученных производных подтверждено данными спектроскопии ЯМР ^1H . Важно, что все полученные новые производные хитина и хитозана хорошо растворимы в воде.

Полученные в рамках данной главы диссертации катионные производные были

протестированы на антимикробную (антибактериальную и противогрибковую) активность *in vitro*. В разделе 2.3 автором показано, что антибактериальная активность селенсодержащих производных как хитина, так и хитозана симбатно зависит от степени замещения полимеров. Этот факт автор объясняет увеличением катионной плотности полимеров с ростом степени замещения, что согласуется с литературными данными. Полимеры с более высокой катионной плотностью в большей степени способны повреждать мембраны микробных клеток, провоцируя гибель микроорганизмов. Автором установлено, что антимикробная активность производных хитозана практически не отличается от антимикробного действия соответствующих производных хитина. На основании этого им сделан логичный вывод, что прямое использование хитина для получения высокоактивных и нетоксичных антибактериальных систем позволяет избежать стадии деацетилирования и значительно снижает экологическую нагрузку при получении.

Раздел 2.4. описывает получение наночастиц на основе селенсодержащих производных хитина и хитозана с использованием классического метода ионного гелеобразования триполифосфатом натрия, а также оценку их антимикробных свойств. Наночастицы охарактеризованы по величине гидродинамического диаметра и ζ -потенциала, по индексу полидисперсности, а также протестированы на противомикробный эффект с использованием того же экспериментального протокола, что и для соответствующих полимеров. Автором выявлено, что антимикробная активность испытанных наночастиц в целом превышает активность исходных полимеров и характеризуется ярко выраженной зависимостью как от гидродинамического диаметра, так и от ξ -потенциала, при этом наиболее активные наночастицы обладали наименьшим гидродинамическим диаметром (около 100 нм) и высоким положительным ξ -потенциалом (около +60 мВ). На основе анализа литературных данных автором сделан общий вывод, что антибактериальная активность полученных производных хитина и хитозана, а также наночастиц на их основе превосходит действие классических антибиотиков (ампициллина и гентамицина) и противогрибкового препарата амфотерицина В.

В разделе 2.5 проведена оценка токсичности *in vitro* синтезированных производных хитина и хитозана, а также наночастиц на их основе с помощью МТТ-теста. Обнаружено, что при концентрациях менее 300 мкг/мл полученные производные, так же как и исходный хитозан, нетоксичны (жизнеспособность клеток во всех случаях составляла около 100 %). При дальнейшем увеличении концентрации высокозамещенные производные проявляли более высокую токсичность, чем низкозамещенные. Токсичность

in vitro полученных наночастиц практически не отличалась от токсичности соответствующих полимеров. Важно, что низкомолекулярные соединения, соответствующие введенному в полимерную цепь структурному элементу, характеризуются достаточно высокой токсичностью (жизнеспособность клеток составляет около 40 % и около 30 % при концентрациях 100 мкг/мл и 300 мкг/мл, соответственно), а введение селенсодержащего гетероциклического антибактериального фрагмента в структуру хитозана резко снижает его токсичность без снижения антибактериального эффекта.

В рамках раздела 2.6 диссертации представлена оценка каталитической активности свободного [1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромида, его нетоксичных (что важно для экологии) производных хитина и хитозана, а также наночастиц на их основе в модельной реакции окисления 1-фенилэтилового спирта в ацетофенон бромом при комнатной температуре. Наночастицы селенсодержащих производных оказались эффективными катализаторами окисления вторичных спиртов в кетоны. Их применение позволило осуществить замену более токсичного хлорорганического растворителя дихлорметана на более экологичный ацетон.

Глава 3 посвящена получению новых конъюгатов ципрофлоксацина с хитозаном и наночастиц на их основе. Автором была поставлена и успешно решена задача – провести сравнение эффективности различных по строению, но близких по составу систем пролонгированного высвобождения фторхинолонов в одинаковых условиях. Для решения поставленной задачи был выполнен синтез производных ципрофлоксацина и хитозана, в которых ципрофлоксацин непосредственно присоединен к полимерной цепи (раздел 3.1); синтез конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан, в которых ципрофлоксацин связан с полимерной цепью через pH-чувствительный спейсер (раздел 3.2); на их основе получены загруженные дополнительно ципрофлоксацином наночастицы (раздел 3.3) и изучена антибактериальная активность наночастиц и конъюгатов *in vitro* (раздел 3.4). Загруженные ципрофлоксацином самоорганизующиеся наночастицы на основе конъюгатов без спейсера продемонстрировали пролонгированную способность к высвобождению антибиотика и наилучший антибактериальный эффект *in vitro* среди всех полученных в рамках данной главы диссертации систем. Автором также показано, что антибактериальный эффект наночастиц *in vivo* превосходил эффект исходного ципрофлоксацина при отсутствии токсичности, которая была почти идентична токсичности хитозана, признанного нетоксичным биополимером. Полученные результаты дают повод рассматривать разработанные наночастицы как системы, представляющие интерес для создания лекарственных форм пролонгированного высвобождения ципрофлоксацина и его адресной

доставки с последующими доклиническими исследованиями. Важно, что использование предложенных систем высвобождения позволит снизить терапевтическую дозу ципрофлоксацина более чем в 3 раза.

Экспериментальная часть содержит достаточно подробное изложение методик синтеза производных и получения биологически активных систем, а также характеристики исходных материалов и описание методов исследования и подготовки образцов. Следует отметить хороший научный базис и компетентность соискателя.

Материал диссертации изложен логично, выводы убедительны, соответствуют полученным экспериментальным данным и подкреплены анализом литературного материала. Большой объем проделанной экспериментальной работы и скрупулезность анализа полученных данных определяют достоверность и обоснованность сделанных автором заключений.

Ценность для науки и практики результатов работы. Диссертация Егорова А.Р. – научно-квалификационная работа, в которой на основе всестороннего исследования выявлены новые возможности создания новых производных и материалов на основе хитозана и хитина экологически чистыми способами; разработаны методики получения в водных средах высокозамещенных производных, наночастиц и конъюгатов на их основе; установлена взаимосвязь структурных характеристик производных, состава и структуры материалов с проявляемыми свойствами (антибактериальная активность (*in vitro* и *in vivo*), биосовместимость, каталитические свойства и др.), что имеет важное значение для создания новых безопасных антибактериальных препаратов и органических катализаторов на основе природных и биосовместимых полимеров.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати. Работа хорошо оформлена, автореферат достаточно полно отображает основные выводы и содержание диссертации. Список опубликованных работ, в том числе 6 статей в реферируемых научных журналах, входящих в базы данных Web of Science и Scopus и, соответственно, в перечень ВАК РФ, 5 статей в сборниках материалов конференций включает практически весь рассмотренный в диссертации материал и подтверждает актуальность, научную новизну и практическую значимость проведенных исследований.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации. Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

Замечания по работе. Однако существует ряд замечаний и пожеланий:

1. Автор, вероятно сознательно, не использует термин «кавитационное воздействие», а именно «ультразвуковое облучение». Что автор предполагает в виде факторов инициирования химического взаимодействия помимо механической и термической активации?

2. В автореферате и диссертации не приведен список использованных сокращений, а в ряде случаев аббревиатуры не раскрыты и в тексте, что затрудняет прочтение работы.

3. Несмотря на то, что автором убедительно доказано, что ультразвуковая обработка существенно сокращает время реакции и требуемый избыток реагента для достижения одной и той же степени замещения при получении селенсодержащих производных хитозана в сравнении с традиционным способом проведения реакции при умеренно повышенной температуре (таблицы 1 автореферата и 4 диссертации), остается непонятным механизм образования селективно и не селективно замещенных продуктов. Если O-замещение возможно, то почему оно совсем не происходит при мольном избытке 1:6? Это тоже много, к тому же водная среда кислая, что снижает нуклеофильность аминогрупп. Были бы достигнуты неселективное замещение и более высокие степени конверсии функциональных групп хитозана при увеличении избытка алкилирующего реагента при УЗ-обработке до сопоставимых с используемыми в традиционном способе значений?

4. Аналогичный вопрос возникает при анализе данных алкилирования хитина: из представленных на рис. 4 данных (соответствующий рис. 1 автореферата) следует, что при проведении реакции при 50°C в продуктах присутствуют O-замещенные производные. Почему этого не происходит при повышении температуры синтеза до 80°C?

5. Как оценивали чистоту продуктов при подготовке образцов для ЯМР спектроскопии? Также следовало привести ссылки на источники, согласно которым сделаны отнесения сигналов ПМР спектров.

6. На стр. 10 Автореферата автор отмечает экологическую опасность гидроксида натрия при применении для активации нуклеофильных свойств гидроксильных групп хитина в реакциях с алкилгалогенидами. Позволю себе не согласиться с автором, так как именно в данном контексте гидроксид натрия должен быть использован в каталитических количествах и, кроме того, будет способствовать связыванию уходящей группы при нуклеофильном замещении, то есть присутствовать после прохождения реакции в виде хлорида натрия.

7. В ряде случаев, полученные результаты, на мой взгляд, обсуждены недостаточно подробно. Например, на стр. 74 диссертации отмечено, что производные хитозана и ципрофлоксацина, полученные с использованием спейсера, не склонны к самоорганизации в растворе, в отличие от производных, полученных непосредственным взаимодействием реагентов. А почему?

8. Работа содержит довольно много описок и опечаток, а также неудачных выражений. Например, в подписи к табл. 12 диссертации автор называет продукты «производными хитозана, конъюгированными с ципрофлоксацином», тогда как речь в данном случае идёт просто о производных хитозана и ципрофлоксацина.

Сделанные замечания не затрагивают основных выводов диссертационной работы Егорова А.Р.

Заключение. Диссертационное исследование Егорова Антона Романовича «Экологические аспекты синтеза и потенциального использования новых систем на основе хитина и хитозана» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научных задач химического синтеза антибактериальных производных хитина и хитозана в экологически чистых условиях, а также разработки систем пролонгированного высвобождения антибиотика ципрофлоксацина, позволяющее снизить в перспективе его потребление, что имеет важное значение для современной экологии. Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, согласно п. 2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов», утвержденного ученым советом РУДН протокол № УС-1 от 22.01.2024 г., а её автор, Егоров Антон Романович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.15 – Экология (химические науки).

Ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией твердофазных химических реакций ИСПМ РАН, доктор химических наук по специальности 02.00.06 – высокомолекулярные соединения (химические науки)



Акопова Татьяна Анатольевна

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

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

Тел.: 8(903)223-76-12

E-mail: akopova@ispm.ru; сайт: <https://ispm.ru>

13 мая 2024 г.

Подпись в.н.с. Акоповой Татьяны Анатольевны

Заверяю

Учёный секретарь ИСПМ РАН, к.х.н.



Гетманова Е. В.