

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание
ученой степени кандидата химических наук
Локовой Анастасии Юрьевны на тему
«Катионные полимеры и поликомплексы для создания
биоцидных покрытий: физико-химический аспект»
по специальности 1.4.7. Высокомолекулярные соединения
(химические науки)

Одна из существенных проблем здравоохранения и ветеринарии – распространение устойчивых (резистентных) патогенных микроорганизмов, затрудняющих борьбу с вызываемыми ими инфекциями. Снижение эффективности действия традиционных препаратов компенсируется созданием новых рецептур с повышенной цитотоксичностью. Создание препаратов с широким спектром действия представляется важным и актуальным. И именно к таким препаратам относятся полимеры с катионными группами, демонстрирующие, в частности, аффинность к анионной мембране клеточной стенки бактериальных клеток, связывание с которой может приводить к нарушению функции клеток и их гибели.

Диссертационная работа Локовой Анастасии Юрьевны посвящена исследованию катионных полимеров и возможности образования ими нестехиометричных интерполимерных комплексов (НИПЭК) различного строения с прицелом на создание такими комплексами биоцидных покрытий, эффективных против разнообразных патогенных микроорганизмов. Работа Локовой А.Ю. представляется весьма интересной и актуальной, поставленная в ней цель была автором четко сформулирована и заключалась в установлении корреляции между молекулярно-массовыми характеристиками поликатиона/ НИПЭК и целостностью биологической мембраны в контакте с поликатионом/ НИПЭК, а также в проведении количественной оценки токсичности поликатиона/НИПЭК по отношению к культивируемым бактериальным клеткам. Автор исследовал физико-химические и бактерицидные свойства полученных НИПЭК (и индивидуальных поликатионов в качестве контроля) в водном растворе и на поверхности и описал механизм взаимодействия катионных рецептур с искусственной биологической и клеточной мембраной.

Автором проведено очень интересное исследование, в котором весьма много данных получено впервые. Новизна диссертационной работы Локовой А.Ю. и в том, что в ней впервые показано, что степень полимеризации определяет взаимодействие катионного ИПЭК с анионными липосомами, и в том что в работе установлено, что

катионный полимер ускоряет высвобождение содержимого из липосом с переключателем, и в том, что в ней впервые проверено, что полимерное покрытие из катионного НИПЭК сохраняет антимикробные свойства после удаления большей части полимеров в ходе их многократного смывания водой и показано, что поликатион связывается с клетками, и впервые описана антимикробная активность нанометровых поликатионных покрытий на гидрофильной поверхности и предложен механизм антимикробного действия катионных полимерных покрытий..

Диссертация Локовой А.Ю. построена по общепринятой схеме и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 117 страницах, содержит 186 ссылок на использованные литературные источники. В работе 42 рисунка, 4 таблицы и 6 формул

Введение диссертации содержит обоснование актуальности, научной новизны и практической значимости, описание методологии и методов исследования. В нем сформулированы цели и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту.

В **Литературном обзоре** описаны полимеры с ионными группами (полиэлектролиты), интерполиэлектролитные реакции, приводящие к формированию НИПЭК, полимерные пленки и покрытия, и биоцидные свойства поликатионов и катионных НИПЭК в растворе и на поверхности.

Экспериментальная часть посвящена описанию исходных материалов и их характеристик, методик получения НИПЭК и липосом и методов исследования: динамического светорассеяния, лазерного микроэлектрофореза, флуориметрии, кондуктометрии, атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии, методов контроля антимикробной активности полученных рецептур. Использование взаимодополняющих современных методов определяет высокий уровень, надежность и воспроизводимость полученных результатов.

Глава **Результаты и обсуждение** содержит пять разделов. Первый раздел посвящен получению агрегативно стабильных катионных НИПЭК из катионного полидиаллилдиметиламмоний хлорида (ПДАДМАХ) и анионного полиакрилата натрия (ПАН) с различной степенью полимеризации полианиона; второй - взаимодействию катионного ПДАДМАХ и катионных НИПЭК с анионными липосомами и тестированию антимикробной активности рецептур в растворе; третий - связыванию катионного полилизина с анионными липосомами со встроенным в мембрану липидом-переключателем; четвертый - формированию покрытий из катионных полимеров и

НИПЭК и исследованию их антимикробной активности; в пятом разделе описан механизм антимикробного действия покрытий с участием катионного полимера.

Основные результаты работы состоят в следующем.

1) Впервые исследовано взаимодействие анионных липосом с НИПЭК ПДАДМАХ-ПАН с избытком катионного ПДАДМАХ. Результат взаимодействия зависит от степени полимеризации полианиона. Добавление поликомплекса с коротким ПАН инициировало протекание конкурентной реакции с образованием бинарного комплекса поликатион-липосома и высвобождением в раствор свободного ПАН. В отличие от этого, поликомплекс с длинным поликатионом взаимодействовал с липосомами как целое, что приводило к формированию тройного комплекса поликатион-ПАН-липосома. Как следствие, поликомплекс с коротким ПАН демонстрировал более высокую бактерицидную активность по сравнению с поликомплексом, содержащим длинный ПАН. Этот механизм определяет стратегию выбора полианиона для получения ИПЭК с максимальным антимикробным действием.

2) Использование модифицированных анионных липосом со встроенным в мембрану липидом-переключателем позволило описать влияние катионного полимера на функциональные сайты биологической мембраны. Липид-переключатель меняет свою конформацию при изменении pH окружающего раствора. Эти изменения формируют в мембране временные дефекты, через которые внутреннее содержимое липосом вытекает во внешний раствор. Эти структурные перестройки напоминают pH-индуцированное открывание пор в биологической мембране. Автор показал, что связывание катионного полилизина с модифицированными липосомами повышает проницаемость липосомальной мембраны, и предложил механизм этого явления, который включает сегрегацию липидов под действием поликатиона и связанное с этим локальное концентрирование молекул липида-переключателя в пределах липосомальной мембраны.

3) Для получения покрытий водные растворы поликатионов или поликомплексов наносили на поверхность стекла и сушили до постоянного веса. Все покрытия удалялись при обработке водой, при этом на поверхности оставался полимерный слой толщиной от 5 до 18 нм в зависимости от состава наносимой рецептуры. Эти предельно тонкие слои (монослои) полимера показали чрезвычайно высокую токсичность по отношению к грамотрицательным бактериям *P. aeruginosa*: до 95% нанесенных на монослой клеток погибали в течение первых 30 минут. Поликомплексные покрытия были более токсичными, чем покрытия из индивидуального поликатиона. В поликомплексе антимикробная активность обеспечивалась катионными группами и взаимно нейтрализованными гидрофобными блоками.

4) Важный результат касался процедуры тестирования выживаемости клеток, нанесенных на поверхность катионного покрытия. Стандартная процедура включает удаление нанесенных клеток стерильной водой, их высевание на питательную среду и подсчет количества колониеобразующих единиц. При этом по умолчанию полагают, что с покрытия смываются мертвые и/или живые клетки без адсорбированного полимера. Вопреки этому мнению автор показал, что смытые частицы представляют собой комплексы клеток с полимерными макромолекулами, количество которых в расчете на одну клетку может достигать нескольких сотен и даже тысяч. Автор провел интересный эксперимент для проверки интерпретации антимикробного действия полимерных покрытий. Проверив заряд смываемых частиц, автор убедительно показал образование комплекса клеток с положительно заряженным полимером.

5) Детальное исследование поведения поликатионов и поликомплекс в водных растворах и на поверхности позволило автору предложить «механизм работы» катионных полимерных покрытий. Механизм включает несколько процессов, которые развиваются параллельно и усиливают антимикробное действие покрытия. Атака поликатиона начинается с его растворения и адсорбции на поверхность клетки в растворе до ее физического контакта с покрытием. Это дает возможность поликатиону связаться с разными поверхностными сайтами клетки и блокировать их функции. Затем клетка достигает покрытия, что сопровождается дополнительно инактивацией активных центров на поверхности клетки. Наконец, поликатион может переходить с покрытия на клетку, внося свой вклад в суммарный антимикробный эффект.

Диссертация представляет собой научно-квалификационную работу, выполненную на современном уровне исследования и обсуждения полученных результатов. Положения, выносимые на защиту, и научные выводы диссертации полностью обоснованы. Достоверность результатов и выводов подтверждается использованием различных современных методов исследования, результаты которых согласуются друг с другом, а также публикацией результатов исследований в рецензируемых российских и международных журналах. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в журналах из перечня ВАК. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Тем не менее, при анализе диссертационной работы Локовой А.Ю. возникли некоторые вопросы и замечания.

1. Раздел "Объекты исследования"

Говорится об использованных липидах для построения липосом: "анионные ДОФХ-ПОФС¹- липосомы со встроенным липидом-переключателем, реагирующим на

изменение pH внешнего раствора". Наверное, следовало здесь в перечислении объектов исследования сказать о том, какой липид использован в качестве переключателя.

2. Раздел «Результаты и обсуждение».

На рис. 1 даны профили зависимости ЭФП от соотношения зарядов полимеров. При этом концентрация $[N^+] = 5 \times 10^{-3}$ М, а буферный раствор с pH 7 — это 10^{-3} М ТРИС. Не очень высокая буферная емкость. Изменение концентрации зарядов идет в довольно широком диапазоне. Не влияет ли это на общий pH раствора? Проверялся ли pH при разных соотношениях зарядов полимеров?

Не может ли изменение размеров комплексов быть как-то связано с изменением pH?

3. Следует отметить, что бислой липидов липосомы, конечно, может быть хорошей модельной системой для мембраны клетки. Но для бактериальных клеток, даже для грамотрицательных, важную роль играет пептидогликан. Возможно, в будущем стоило бы учесть этот факт при разработке модельных систем.

4. Не очень понятно, почему в эксперименте с флипосомами при pH 5 был использован 10^{-3} М ТРИС буферный раствор, который не предназначен для использования при таких pH. Не может ли быть связан эффект вытекания соли с изменением pH раствора?

5. Грамположительные патогены оказались гораздо более чувствительными к действию полимеров, однако обсуждения этого явления не приведено. Оно, как мне кажется, было бы не лишним, т.к. у грамположительных микроорганизмов как раз не мембрана снаружи, а толстый слой пептидогликана.

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационной работы, часть из них являются в большей степени пожеланиями на будущее. В целом работа производит весьма благоприятное впечатление. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.4.7. Высокомолекулярные соединения (химические науки), а именно пункту «9. Целенаправленная разработка полимерных материалов с новыми функциями и интеллектуальных структур с их применением, обладающих характеристиками, определяющими области их использования в заинтересованных отраслях науки и техники», а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой

степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Локова Анастасия Юрьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.7. Высокомолекулярные соединения.

Официальный оппонент:

доктор химических наук,
профессор
заведующий кафедрой химической энзимологии
химического факультета Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Московский государственный
университет имени М. В. Ломоносова»,
Клячко Наталья Львовна

17 ноября 2025 г.

Контактные данные:

Тел.: +7 9 39 34 76; e-mail: klyachko@enzyme.chem.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена докторская диссертация:

02.00.15. Кинетика и катализ (химические науки)

Адрес места работы:

119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 11Б, комн. 204

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
химический факультет, кафедра химической энзимологии

Тел.: +7(495) 939-34-76; e- mail: klyachko@enzyme.chem.msu.ru

Подпись сотрудника МГУ имени М.В. Ломоносова

Клячко Н.Л. заверяю:

17 ноября 2025 г.

Мошина Д.Х.