

КОСТЮКОВ АЛЕКСЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ФОТОХИМИЯ ГЕПТАМЕТИНОВЫХ ЦИАНИНОВЫХ, ТРИМЕТИНОВЫХ
БИСЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С
БИОМАКРОМОЛЕКУЛАМИ**

02.00.04 – физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва

2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Научный руководитель: Доктор химических наук, профессор **Кузьмин Владимир Александрович**;

Официальные оппоненты: Доктор химических наук, профессор **Корчак Владимир Николаевич**, заведующий лабораторией гетерогенного катализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н. Н. Семенова Российской академии наук

Доктор физико-математических наук **Хренова Мария Григорьевна**, ведущий научный сотрудник химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»;

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химической физики Российской академии наук

Защита диссертации состоится « » 20 г. в 12⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, г. Москва, Косыгина 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект д. 38 и на вебсайте https://biochemphysics.ru/assets/upload/documents/dissertaczii/Dissertaciya_Kostukov.pdf

Автореферат разослан « » 20 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д.002.039.01

кандидат химических наук

Мазалецкая Лидия Ивановна

Актуальность работы:

Цианиновые красители (ЦК) исходно применялись в качестве материалов для сенсibilизации в галид-серебряной фотографии на протяжении 19 и 20 веков. Во второй половине 20 века они использовались в качестве рабочих тел лазеров и систем хранения информации. ЦК продолжили свое развитие в качестве флуоресцентных маркеров и фотоактивных молекул, а также конъюгатов с биомолекулами в биологии и медицине.

Настоящая работа посвящена изучению быстрых фотохимических процессов цианиновых красителей в различных средах: в растворах органических растворителей и молекулярно-организованных системах в комплексах с биомакромолекулами. Эффективное накопление цианиновых красителей в раковых клетках позволяет использовать их не только в качестве фотосенсibilизаторов, но и в качестве молекул-носителей. Научный интерес к фотохимии ЦК позволит найти новые эффективные фотосенсibilизаторы для фотодинамической терапии. Создание современных препаратов для оптической медицинской визуализации и фотосенсibilизаторов (ФС) с высоким сродством к раковым клеткам является перспективной технологией для диагностики и лечения.

Важным критерием эффективности ЦК является способность к транспорту по кровяному руслу. Оценка эффективности доставки происходит по способности связывания с основным транспортным компонентом крови: человеческим сывороточным альбумином (ЧСА). Полученные значения констант связывания могут существенно варьироваться в зависимости от структуры исследуемого соединения.

Большой интерес представляют красители, способные к переходу в триплетное состояние под действием прямого фотооблучения. ЦК обладают способностью накапливаться в раковых клетках. ФС на их основе способны под действием света генерировать активные формы кислорода (АФК). АФК приводят к возникновению окислительного стресса у клеток, приводящему к гибели по механизмам некроза и/или апоптоза.

Необходимым условием применения ЦК в фотомедицине является высокая молярная экстинкция в области, где свет проходит несколько миллиметров в ткани, область так называемого «ИК-окна», расположенное в диапазоне между 640 и 870 нм.

Цианиновыми красителями, обладающими фотохимической активностью в ближнем ИК-диапазоне являются линейные гептаметиновые красители (Ц7), имеющие 7 атомов углерода в цепи, связывающей гетероциклы, и бискарбоцианиновые красители (БКЦ), имеющие по 3 углерода в структуре и связывающие линейно три гетероцикла через центральный. В БКЦ при обобществлении хромофорных систем, благодаря эффектам туннелирования электрона через центральный гетероцикл и расщепления синглетного уровня, происходит образование двух полос поглощения.

Большое влияние на процессы связывания, флуоресценции и фотосенсибилизации оказывает структура соединений, введение заряженных групп, водорастворимость и объем заместителей. Объемные фрагменты за счет «зонтичного эффекта» могут оказывать влияние на связывание с ЧСА/ЛНП.

Цель исследования:

Физико-химическими оптическими методами определить основные закономерности взаимодействия красителей ближнего ИК-диапазона с биомакромолекулами, охарактеризовать механизмы действия фотосенсибилизаторов на основе красителей с сопряженными хромофорными системами, а также дать оценку возможности применения новых реагентов для оптической медицинской визуализации на основе цианиновых красителей ближнего ИК-диапазона.

Задачи исследования

Для выполнения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

- методами спектрофотометрии и спектрофлуориметрии охарактеризовать механизмы процесса комплексообразования с биомакромолекулами на примере гептаметиновых цианиновых и бискарбоцианиновых красителей;
- определить влияние заместителей в молекулах гептаметиновых цианиновых и бискарбоцианиновых красителей на процессы связывания с альбумином;
- определить состав комплекса, образующегося при связывании красителя с ЧСА;
- импульсными методами охарактеризовать спектрально-кинетические характеристики короткоживущих промежуточных частиц, анион-радикалов ЦК, образующихся при фотолизе ЦК в различных растворителях;

Объектом исследования являлись индотрикарбоцианиновые и бискарбоцианиновые красители и их комплексы с биомакромолекулами.

Предмет исследований: спектрально-кинетические характеристики возбужденных состояний цианиновых красителей в органических растворителях и их комплексов с биомакромолекулами в водной фазе.

Научная новизна работы: в рамках диссертационной работы были установлены спектрально-кинетические характеристики серии новых цианиновых красителей. Показана их способность связываться с биомакромолекулами, по изменениям спектров поглощения и флуоресценции рассчитаны значения констант связывания. Флуориметрически показана высокая эффективность накопления исследуемых соединений в клетках аденокарциномы. При выполнении работы показана эффективность применения бискарбоцианиновых красителей для

фотодинамической терапии. Методом импульсного фотолиза зарегистрировано триплетное состояние молекул цианиновых бискрасителей при прямом фотовозбуждении с биополимерами. На основе полученных результатов о фотоактивности бискарбоцианиновых красителей предложен фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии, включающий нековалентный конъюгат бискрасителя и химерного белка, характеризующегося аминокислотной последовательностью рецептор-связывающего домена альфа-фетопротейна человека. Получен патент на изобретение RU2638131C1 «Фотосенсибилизатор на основе карбоцианинового красителя для фотодинамической терапии опухолей». Показано фотодинамическое воздействие бискарбоцианиновых красителей на раковые клетки серии НСТ116.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Гептаметиновые цианиновые красители связываются с гидрофобным участком между сайтами связывания альбумина;
2. Комплексообразование ЦК с альбумином приводит к образованию двух видов комплексов. БКЦ связываются с химерными белками, которые являются эффективными носителями;
3. Изменение типа комплекса БКЦ и альбумина не зависит от концентрации белка и является реакцией первого порядка;
4. Комплексообразование с биомакромолекулами увеличивает жесткость структуры молекулы и уменьшает вклад безызлучательных переходов в деградации энергии синлетно-возбужденного состояния;
5. При помощи молекулярного докинга и молекулярной динамики произведен анализ расположения молекулы красителя в центре связывания;
6. Процесс фотоизомеризации молекулы красителя конкурирует с интеркомбинационной конверсией и определяет квантовый выход триплетного состояния;
7. Близость молекулы красителя к центру связывания альбумина оказывает существенное влияние на процесс фотопереноса электрона с участием триплетных состояний от ароматических аминокислот белка к молекуле красителя;
8. Доставка ЦК в клетки осуществляется в виде комплекса ЦК-альбумин, что предотвращает нежелательный процесс агрегации красителя;
9. Введение в молекулу красителя этоксигрупп приводит росту величины константы связывания;

Результаты работы были представлены на: «Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты»: Конференция молодых ученых и VIII школа им. Н.М. Эмануэля (Москва),

Москва, Россия, 28-30 ноября 2019; Пятый междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии», Москва, Россия, 30 октября - 1 ноября 2019; 17th International Congress on Photobiology, Испания, 26-30 августа 2019; 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry MedChem Russia 2019, Екатеринбург, Россия, 10-14 июня 2019; 4-ая Российская конференция по медицинской химии (МедХим-2019) с международным участием Екатеринбург, 9-14.06.2019, Екатеринбург, Россия, Четвертый междисциплинарный научный форум с международным участием "новые материалы и перспективные технологии" (Москва, Россия, 27-30 ноября 2018), XVII Ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы "Биохимическая физика", ИБХФ РАН, (Москва, Россия, 13-15 ноября 2018), XXX Симпозиум Современная химическая физика (г. Туапсе, Россия, 16-27 сентября 2018), XXXI Симпозиум Современная химическая физика, Туапсе, Россия, 16-25 сентября 2019; V Всероссийская конференция с международным участием по органической химии, (Владикавказ, Россия, 10-14 сентября 2018), International Symposium on Photochemistry (Дублин, Ирландия, 9-13 июля 2018), XXII Всероссийский симпозиум молодых ученых по химической кинетике 2016, Международная конференция по фотохимии СЕСР (Австрия 2016), II Всероссийская Конференция по молекулярной онкологии 2016.

Связь работы с научными программами и проектами. Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, соглашение № 14.613.21.0042 (11 ноября, 2015), уникальный код RFMEFI61315X0042, Российского научного фонда по проекту № 18-13-00463 «Механизмы фотохимических процессов в комплексах полиметиновых красителей с двумя сопряженными хромофорами и белков», Российского фонда фундаментальных исследований по проекту № 18-33-01112 «Спектрально-кинетические характеристики комплексов полиметиновых красителей, содержащих две хромофорные системы с биомакромолекулами».

Публикации: Материалы диссертационной работы опубликованы в 9 статьях в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК, 10 тезисах докладов на конференциях и симпозиумах.

Степень достоверности полученных результатов.

Достоверность результатов обусловлена использованием прямой регистрацией сигналов в кинетических методах исследований. Корректность применяемой методики работы для используемых физикохимических и оптических методов исследования подтверждает достоверность результатов благодаря применению современной регистрирующей аппаратуры: использования для регистрации осциллографов с разрешающей способностью до 6×10^{11} точек в секунду, флуоресцентных детекторов для счета единичных фотонов с 4 пс разрешением. Полученные результаты использовали для оптимизации модели, которая была построена по

данным моделирования вычислительными методами. Данный подход позволил добиться высокой достоверности предлагаемой модели, расхождение результатов с которой не превышает 15%. При анализе полученных данных руководствовались оценкой вероятности ошибок первого и второго рода, используя положительный и отрицательный контроль в граничных условиях метода.

Структура и объем работ: Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, выводов, списка используемых сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 148 источников. Диссертация иллюстрирована 9 таблицами, 52 рисунками, объем 139 страниц печатного текста.

Личный вклад автора: Диссертантом проведен обширный литературный поиск, позволивший произвести постановку задач. Диссертантом выполнен весь объем физико-химических исследований, полностью проанализирован весь массив полученных данных по физико-химическому анализу и компьютерному моделированию, сформулированы положения, выносимые на защиту и выводы. Полученные научные результаты представлены на международных и всероссийских конференциях, диссертантом подготовлены и опубликованы статьи в реферируемых журналах. Моделирование комплексообразования методом молекулярного докинга проводили в системе AutoDock Vina 1.1.2, UCSF Chimera 1.10.2 и Sybyl-X 2.1 совместно с сотрудниками Химического факультета МГУ В.А. Палюлиным, Е.В. Радченко, М.Г. Местергази. Клеточные тесты и конфокальная микроскопия действия фотосенсибилизаторов выполнялись совместно с сотрудниками ФГБУН Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН А.В. Шibaевой, А.Ш. Радченко.

Теоретическая и практическая значимость работы:

Впервые было охарактеризовано влияние комплексообразования бискарбоцианиновых красителей с биомакромолекулами на процесс быстрого фотопереноса электрона. Была охарактеризована модельная система реакции переноса электрона и доказана ее эффективность по образованию полувосстановленной формы красителя. Предложенный механизм переноса электрона от донора был отработан в экспериментах по импульсному фотолизу комплекса красителя с белком. Было продемонстрировано, что после переноса электрона от донора (ароматический амин, аскорбиновая кислота, стабильный радикал) к акцептору (красителю) происходит образование долгоживущей активной частицы, способной в живой клетке генерировать супероксид анион радикал.

В рамках работы описаны механизмы действия фотосенсибилизаторов на основе бискарбоцианиновых красителей на модельной линии клеток НСТ116. Установлено, что

липофильность и положительный заряд увеличивают константу связывания. Показана фототоксичность исследованного бискарбоцианинового красителя.

Содержание работы

Во введении обоснованы актуальность темы работы, выбор объектов исследования, сформулированы основная цель и задачи, обозначена научная новизна, практическая значимость и положения, выносимые на защиту.

Глава 1. Обзор литературы.

Обзор литературы состоит из двух частей. Первая часть посвящена общим сведениям о цианиновых красителях и особенностям их строения. Вторая часть посвящена обзору имеющихся литературных данных о применении цианиновых красителей ближнего ИК-диапазона для фотодинамической терапии и медицинской визуализации.

На основании проведенного литературного поиска было установлено, что процесс комплексообразования цианиновых красителей с различными заместителями в гетероциклических фрагментах и полиметиновой цепи оказывает влияние на фотохимические и фотофизические свойства данного класса соединений: спектры поглощения, процессы фотоизомеризации, квантовые выходы флуоресценции и триплетного состояния.

Деградация энергии синглетного возбуждения красителей происходит по трем конкурирующим механизмам: фотоизомеризации, флуоресценции и интеркомбинационной конверсии, вклад которых определяется строением и окружением молекулы красителя. Ускорение интеркомбинационной конверсии возможно под действием эффекта тяжелого атома, а также под действием введенного в ЦК фрагмента стабильного радикала.

Глава 2. Материалы и методы.

Вторая глава содержит описание экспериментальных методик и методов обсчета полученных данных. Константы связывания определяли по уравнению доли связывания исследуемых соединений с белком с применением программы GraphPad Prism 6.

Спектры поглощения и флуоресценции зарегистрированы в этиловом спирте/фосфатно-солевом буфере в кварцевых кюветах (10 мм × 10 мм) на спектрофотометре «Shimadzu UV-3101 PC» («Shimadzu», Япония) и на флуориметре Панорама (Россия).

Времена жизни флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре FluoTime 300 («PicoQuant», Германия) в режиме счета единичных фотонов.

Спектрально-кинетические характеристики короткоживущих промежуточных продуктов регистрировали на установке импульсного фотолиза. Регистрация поглощения осуществлялась с помощью фотоумножителя ФЭУ-38 в области 370–800 нм или фотодиода Burr-Brown OPT101 в диапазоне 550-1100 нм.

Наносекундный импульсный фотолиз проводили на установке LKS80 (“Applied Photophysics”, Великобритания), фотовозбуждение при 355 нм или 400-680 нм, 20 мДж, 5 нс. Для удаления кислорода воздуха продували аргонном особой чистоты в течение 10 мин.

Процесс докинга молекул красителя и ЧСА моделировались с помощью программного обеспечения AutoDock Vina 1.1.219. Молекулы лиганда анализировали в ионизированной форме. Атомные заряды рассчитывались по методу Гастейгера-Хюккеля, а геометрические параметры оптимизировались с помощью силового поля Tripos в программном обеспечении Sybyl-X 2.1.20 моделирование молекулярной динамики было выполнено с помощью пакета GROMACS 2018.421 на высокопроизводительном графическом процессоре NVIDIA GeForce GTX 1080 с использованием силового поля CHARMM3622 для белка, общего силового поля CHARMM (CGenFF) 4.123 для лиганда и модели воды TIP3C. Для анализа и визуализации результатов была использована программа crrtraj24 в пакете AmberTools 1825, а также UCSF Chimera 1.13.126 и Sybyl-X 2.1.20.

Глава 3. Результаты исследования.

Цианиновые красители обладают исключительно высокими показателями молярной экстинкции и интенсивной флуоресценцией. Кроме того, они обладают способностью взаимодействовать с биомолекулами как в составе конъюгатов, так и сами по себе.

В первой части работы охарактеризованы фотофизические и фотохимические характеристики ранее не описанных гептаметиновых цианиновых красителей. Представлены характеристики процессов комплексообразования серии исследуемых красителей с альбумином.

1. Были установлены спектрально-кинетические характеристики красителей (ИКЦ2-3), близких по строению ИКЦ1 (ICG), содержащие фосфонатную и фосфовую группы в линкере при атоме азота гетероциклического фрагмента.

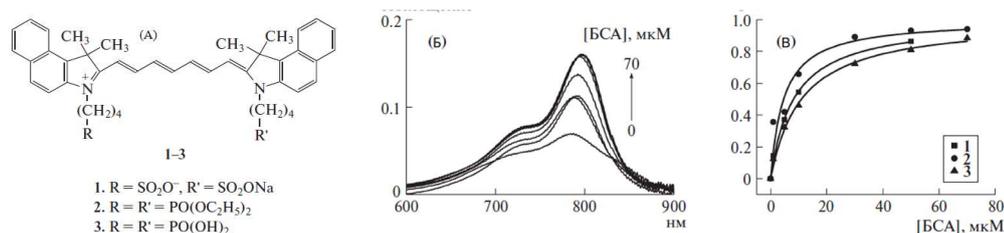


Рисунок 1 – Спектральные характеристики ИКЦ. А. Структура красителей ИКЦ1-3; Б. Спектры поглощения соединения ИКЦ2 (4.5×10^{-7} М) в отсутствие и в присутствии БСА (1×10^{-6} – 7×10^{-5} М). В. Кривые связывания для соединений ИКЦ1–3.

Новые трикарбоцианиновые ИКЦ2,3 (Рисунок 1), были охарактеризованы электронными спектрами поглощения и флуоресценции. Спектры поглощения синтезированных красителей содержат одну полосу с колебательной структурой в области ближнего ИК-диапазона.

Сравнительный анализ новых фосфорилированных красителей ИКЦ2,3 и кардиолина ИКЦ1 с точки зрения образования комплексов с ЧСА показал увеличение констант связывания при переходе от кардиолина к красителю с алкилфосфонатными заместителями, что подтверждает существование дополнительного взаимодействия между этокси-группами фосфорилированных красителей и альбумином (Таблица 1), а также со специфическим гидрофобным взаимодействием метиленовых групп красителя с соответствующими сайтами в молекуле альбумина.

Таблица 1 Константы связывания K_b ($M \pm m$), времена (τ_1 и τ_2) жизни флуоресценции комплексов красителей ИКЦ1–3 с БСА (ошибка 10%, в скобках приведен вклад соответствующего комплекса во флуоресценцию) и растворов красителей (τ) в H_2O и EtOH

Соединение	$K_b \times 10^{-5}, M^{-1}$	τ_1 (БСА), пс	τ_2 (БСА), пс	τ (H_2O), пс	τ (EtOH), пс
ИКЦ1	$1,2 \pm 0,2$	808 (62%)	365 (38%)	245	540
ИКЦ2	$2,2 \pm 0,8$	742 (79%)	212 (21%)	264	590
ИКЦ3	$0,9 \pm 0,1$	741 (78%)	213 (22%)	260	590

В ходе процесса комплексообразования агрегаты красителей ИКЦ1–3 диссоциируют, и с белком могут взаимодействовать как молекулярная форма красителя, так и агрегаты красителя. В условиях эксперимента обеспечивалось практически полное связывание красителя с БСА, при этом кривые затухания флуоресценции описываются двумя экспонентами – с более коротким временем жизни τ_2 , близким к τ (H_2O), и более длинным τ_1 , большим чем τ (EtOH) (Таблица 1). Это указывает на образование двух типов комплексов с БСА: в водном буферном растворе происходит разрушение агрегатов красителя, и один из сайтов БСА взаимодействует с молекулярной формой красителя с образованием более жесткой молекулярной структуры красителя, что затрудняет фотоизомеризацию полиметиновой цепи и приводит к увеличению времени жизни флуоресценции для красителей ИКЦ1-3 по сравнению с раствором в этаноле.

Показано образование двух типов комплексов с разными временами жизни синглетного возбужденного состояния между новыми красителями и альбумином. Учитывая характер структур красителей ИКЦ1-3 и величину константы связывания, можно сделать вывод, что вклад кулоновского взаимодействия в формирование комплексов незначителен. Взаимодействие между БСА и красителем происходит в результате взаимодействия полиметиновых фрагментов красителей с сайтами связывания молекулы альбумина. Это предположение подтверждается докинггом комплекса молекул красителей ИКЦ1-3 в БСА.

Квантовые выходы флуоресценции красителей в этаноле были определены при фотовозбуждении растворов красителей при 760 нм и оптической плотности 0.07, для предотвращения влияния эффекта внутреннего фильтра. В качестве стандарта был использован

раствор красителя ИКЦ1, квантовые выходы для красителей ИКЦ2,3 составили менее 1%. Полученные значения времен жизни флуоресценции свободного красителя ИКЦ2 в этаноле 595 пс и в воде 246 пс сопоставимы со значениями для ИКЦ1. При прямом импульсном фотовозбуждении растворов синтезированных красителей серии ИКЦ в EtOH в отсутствие кислорода не было зарегистрировано короткоживущего поглощения, которое можно было бы связать с образованием триплетного состояния, что указывает на чрезвычайно малый вклад интеркомбинационной конверсии в процесс деградации энергии возбужденного синглетного состояния. Методом импульсного фотолиза с использованием триплет-триплетного переноса энергии от антрацена на молекулы красителей были зарегистрированы спектры поглощения триплетов и измерена кинетика гибели триплетов синтезированных красителей (времена жизни триплетов красителей в этих экспериментах составили 10^{-3} с) (Рисунок 2). Все красители ИКЦ имели интенсивное триплет-триплетное поглощение в ближней ИК-области с максимумом при 900 нм.

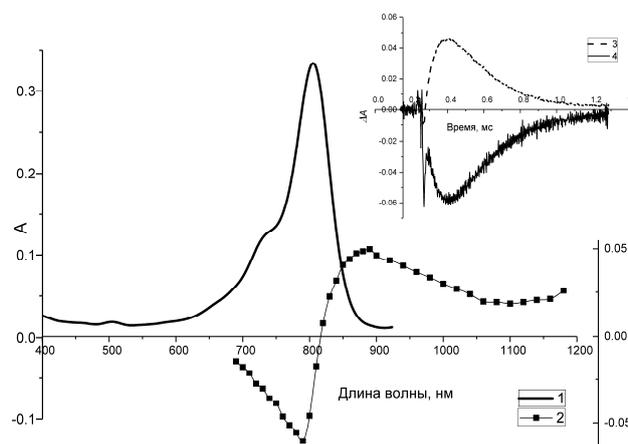


Рисунок 2 – Дифференциальный спектр красителя ИКЦ1 в EtOH. 1 – синглетный. 2 – спектр триплетного состояния ИКЦ1 при сенсibilизации антраценом. 3 – кинетика образования наведенного поглощения на длине волны 860 нм, 4 – кинетика выцветания красителя на длине волны 760 нм.

Таким образом, чрезвычайно низкий квантовый выход триплетного состояния при прямом фотовозбуждении дает возможность рекомендовать к использованию соединения серии ИКЦ в качестве флуоресцентных меток в медицине. При этом в этих системах не будет наблюдаться нежелательных процессов фотосенсибилизации.

Проведена оценка внутриклеточного накопления трикарбоцианинов ИКЦ2,3 на клетках рака кишки (линия НСТ116). Фотофизические и биологические свойства новых соединений свидетельствуют о возможности их использования в качестве биосовместимых маркеров клеток и тканей.

Результаты докинга указывают на значительное сходство оптимальных связанных конформаций для исследуемых соединений (Рисунок 3). Их молекулы располагаются в обширном умеренно полярном кармане между поддоменами альбумина IIА и IIIА. При этом один из замещенных бензоиндольных фрагментов ориентирован вглубь кармана, а второй бензоиндольный фрагмент и более полярные сульфонатные или фосфонатные группы – наружу. Установлено, что основной вклад в комплексообразование вносят именно гидрофобные взаимодействия между молекулой красителя и белка.

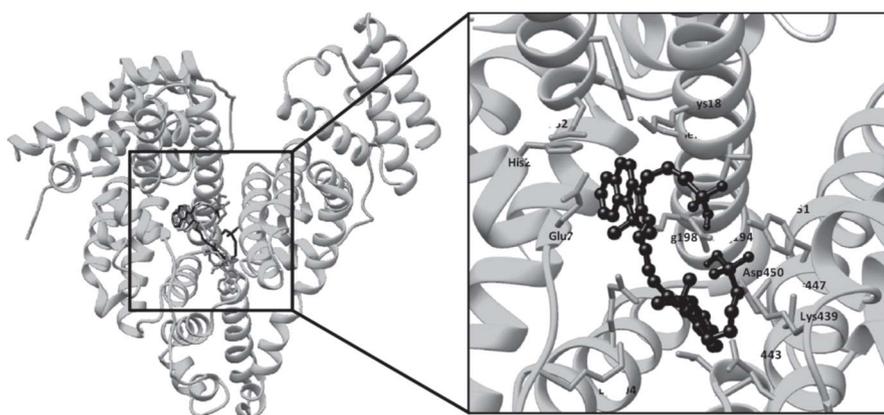


Рисунок 3 - Размещение красителя ИКЦ2 между субдоменами IIIА и IIIВ

Спектрально-кинетические характеристики бискарбоцианиновых красителей.

Особое место среди цианиновых красителей занимают красители, содержащие в молекуле два сопряженных хромофора. В молекулах бискарбоцианиновых красителей (Рисунок 4) проявляются два эффекта: диполь-дипольное взаимодействие и туннелирование электронов через центральный гетероцикл. Результатом этих эффектов является расщепление возбужденных уровней, что приводит к сильному батохромному смещению в спектре поглощения.

Важным элементом механизма доставки фотосенсибилизатора в раковую клетку при проведении фотодинамической терапии является процесс комплексообразования между фотосенсибилизатором и белками крови (Рисунок 5).

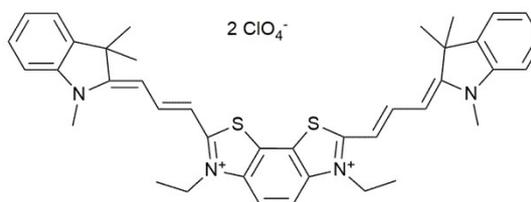


Рисунок 4 - Структура БКЦ1.

Характеристики связывания БКЦ1 с ЧСА (Рисунок 5), динамика внутриклеточного накопления и локализации комплекса БКЦ-ЧСА были изучены с помощью оптической спектроскопии (Таблица 2).

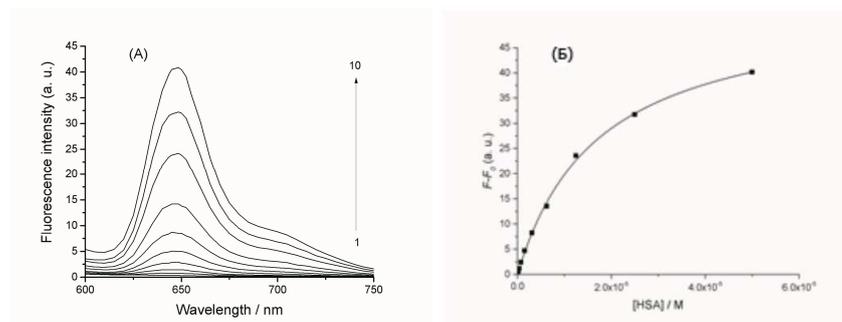


Рисунок 5 - Связывание БКЦ с альбумином. А. Спектры поглощения соединения БКЦ1 (4.5×10^{-7} М) в отсутствие и в присутствии БСА (1×10^{-6} – 7×10^{-4} М) Б. Кривые связывания для соединения БКЦ1.

Кинетики гибели флуоресценции БКЦ1 в этаноле и в содержащем белок растворе описываются одной и двумя экспонентами соответственно.

Таблица 2 - Времена жизни флуоресценции БКЦ1 (2 мкМ) в этаноле, PBS и в присутствии ЧСА в PBS, λ_{exc} 510 нм, λ_{reg} 640 нм.

	Этанол	PBS	ЧСА, 1 мкМ	ЧСА, 10 мкМ	ЧСА, 50 мкМ
τ_1 , нс	0,15	0,11	0,10	0,17	-
I_1 , %	100	91	39	9	-
τ_2 , нс	-	1,02	1,00	1,00	1,00
I_2 , %	-	9	27	35	29
τ_3 , нс	-	-	2,64	2,50	2,50
I_3 , %	-	-	34	56	71
χ^2	1,03	1,09	1,04	1,05	1,08

Создание комплекса между фотосенсибилизатором и белком повышает с одной стороны растворимость фотосенсибилизатора и с другой стороны улучшает процесс доставки фотосенсибилизатора в клетку. В качестве такого белка были взяты ЧСА и модифицированный третий домен альфа-фетопротейна человека (АФП), строение которого позволяет образовывать комплексы с различными красителями-фотосенсибилизаторами.

Анализ изменения спектров флуоресценции при титровании раствора красителя белком позволил провести расчёт констант связывания для комплекса с ЧСА и БКЦ1 и для комплекса БКЦ1 с АФП: с ЧСА $K_b = 5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, с АФП $K_b = 1.1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$. Возможными кандидатами на центры связывания АФП с БКЦ2 являются: FBS3 (fatty acid-binding site) – один из трех участков связывания жирных кислот (419–438), HEBS1 (human estrogen-binding site) – основной эстрогенсвязывающий участок АФП человека (а.о. 428–449); HEBS2 (human estrogen-binding site) – дополнительный эстрогенсвязывающий участок АФП человека (а.о. 458–471). Также дополнительным центром связывания может служить искусственно введенный в состав белка

конструкции рAFP28D3PolyGlu элемент в виде 22 tandemно-расположенных остатков глутаминовой кислоты, способных взаимодействовать с положительными зарядами красителей БКЦ2 и БКЦ3 за счет кулоновского взаимодействия. Сильное кулоновское взаимодействие приводит к образованию более стабильного комплекса с α -фетопротеином по сравнению с ЧСА для БКЦ2, у которого имеется двойной положительный заряд.

Был исследован цианиновый краситель, имеющий в своей структуре новый мотив на основе пиридина (БКЦ4), введенный в центральную позицию полиметиновой цепи. Данная модификация является оригинальным решением, которое позволяет создать сопряженную бихромовую систему в структуре, близкой к трикарбоцианиновым красителям по геометрическим параметрам (Рисунок 6).

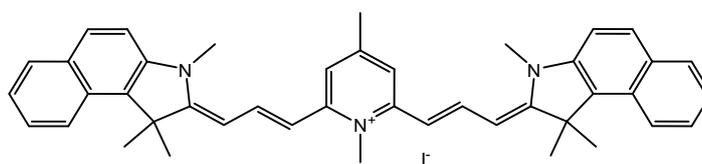


Рисунок 6 - Краситель БКЦ4

Для оценки эффективности связывания с альбумином были использованы методы абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии, а также времяразрешенной флуоресцентной спектроскопии в режиме счета единичных фотонов.

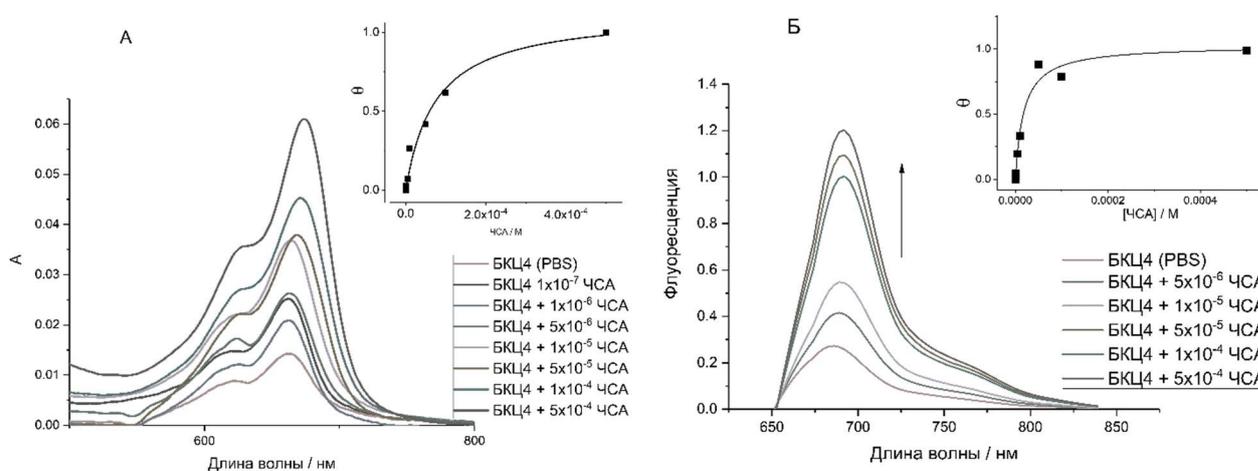


Рисунок 7 - Спектры поглощения (А) и флуоресценции (Б) красителя БКЦ4 (1×10^{-7} М) с ЧСА (1×10^{-7} - 1×10^{-4} М). Вставка: экспериментальные значения θ в зависимости от концентрации белка.

Образование комплексов с белком сопровождается изменением спектров поглощения и флуоресценции, характеризуется смещением положения пиков в длинноволновую область на 10 нм (Рисунок 7). Разгорание флуоресценции, происходящее при добавлении альбумина к раствору красителя в фосфатно-солевом буфере, указывает на увеличение жесткости структуры молекулы красителя в комплексе с белком. Методами абсорбционной ($K_b = (9.0 \pm 1.0) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) и

флуоресцентной ($K_b = (1,1 \pm 0,1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) спектроскопии были установлены значения констант для исследуемых комплексов краситель-альбумин. Анализ соотношения времен жизни флуоресценции комплексов при увеличении концентрации белка подтверждается данными анализа кинетики затухания флуоресценции. В отсутствие альбумина краситель характеризуется временем жизни флуоресценции 0.2 нс. В присутствии альбумина происходит образование комплексов и время жизни увеличивается, что обусловлено образованием двух долгоживущих синглетно-возбужденных частиц с временами жизни 1 нс и 1.6 нс, флуоресцирующих в длинноволновой области (740-790 нм) (Таблица 3).

Таблица 3 - Время жизни флуоресценции τ (нс) БКЦ4 с различными концентрациями ЧСА при различных длинах волн регистрации, относительные амплитуды компонентов в % приведены в скобках.

[HSA]/M	$\tau_1/ \text{нс} (A_1 \%)$	$\tau_2/ \text{нс} (A_2 \%)$	$\tau_3/ \text{нс} (A_3 \%)$	χ^2
660 нм				
10^{-6}	0,20 (97)	0,87 (3)	–	1,56
10^{-5}	0,18 (71)	0,80 (16)	1,75 (13)	1,02
10^{-4}	0,19 (32)	0,83 (31)	1,79 (37)	1,37
690 нм				
10^{-6}	0,20 (96)	1,26 (4)	–	1,44
10^{-5}	0,19 (40)	0,92 (22)	1,68 (38)	1,09
10^{-4}	0,22 (13)	0,96 (36)	1,65 (51)	1,25
740 нм				
10^{-6}	0,20 (82)	1,21 (18)	–	1,35
10^{-5}	0,19 (43)	0,95 (24)	1,65 (33)	1,17
10^{-4}	0,20 (15)	0,96 (40)	1,65 (45)	1,38
790 нм				
10^{-6}	0,20 (77)	1,23 (23)	–	1,32
10^{-5}	0,20 (37)	1,11 (40)	1,80 (23)	1,39
10^{-4}	0,24 (15)	1,03 (45)	1,68 (40)	1,27

Данные о связывании, характеризующие свойства красителя демонстрируют влияние эффекта «замороженной структуры» на торможение процессов изомеризации и подтверждают образование комплекса краситель-белок. Образуются два типа комплексов с различными флуоресцентными свойствами.

Возможные взаимодействия между молекулой БКЦ4 и ЧСА (модель белка была взята PDB: 4L9Q) были проанализированы с использованием методов молекулярного докинга и молекулярной динамики. Положение молекулы БКЦ4 в структуре ЧСА показывает существенное сходство с оптимальным режимом связывания для трикарбоцианиновых

красителей, найденным ранее путем молекулярного докинга, хотя точное положение и конформация лиганда несколько отличаются. Молекула БКЦ4 расположена в широком, умеренно полярном кармане между субдоменами IIА и IIIА альбумина (рисунок 8). Один замещенный бензоиндолиновый фрагмент вводится глубоко в карман, в то время как другой фрагмент ориентирован на внешнюю поверхность белка.

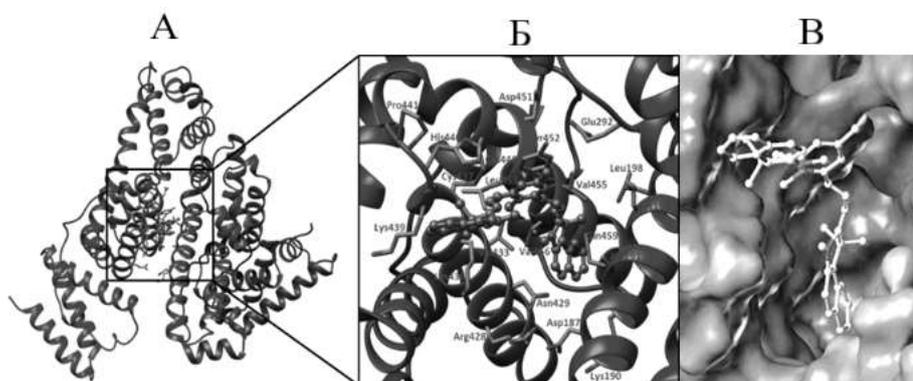


Рисунок 8 - Связывание БКЦ4 с ЧСА. А - общий вид структуры ЧСА и положение сайта связывания полиметинового красителя. Б - детальная структура сайта связывания полиметинового красителя. Аминокислотные остатки, расположенные в пределах 4 Å от него, показаны в виде бежевых моделей. В - вид кармана для связывания красителя в структуре ЧСА.

Длина внутренней полиметиновой цепи составляет $4,8 \pm 0,1 \text{ \AA}$ (среднее значение $\pm SD$), в то время как длина внешней цепи составляет $4,4 \pm 0,1 \text{ \AA}$. Угол между хромофорами (измеренный между атомами ауксохрома азота бензоиндолина и пиридина) составляет $120 \pm 7^\circ$, что хорошо согласуется со значением, оцененным по спектральным данным.

Эффект фотодеградации БКЦ.

В ходе проведения экспериментов с БКЦ была отмечена деградация растворов красителя. Изменение спектральных характеристик растворов при стоянии приводило к ухудшению воспроизводимости результатов, что потребовало изучения свойств растворов красителя. Исследование проводилось с использованием оптической абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии. Установлена зависимость степени окисления от концентрации БКЦ в присутствии и отсутствии кислорода. Обнаружена моноэкспоненциальная зависимость оптического поглощения раствора БКЦ от времени облучения. Увеличение характерного времени фотопреобразования объясняется эффектом агрегации красителя в растворе. Рост скорости фототрансформации красителя в присутствии кислорода объясняется образованием синглетного кислорода вследствие передачи энергии из триплетного состояния, возбужденного красителем, на молекулярный кислород. Квантовый выход активных форм кислорода определен

относительным химическим методом. Предложена возможная структура фотопродукта красителя, основанная на сходстве его спектральных характеристик и характеристик монохромного цианинового красителя.

Фотохимия возбужденных состояний бискарбоцианиновых красителей

Появление новой интенсивной полосы поглощения в красном и ближнем ИК диапазоне (Рисунок 9), в сочетании с высоким квантовым выходом интеркомбинационной конверсии (**ИКК**), открывает возможность использовать бискарбоцианины как перспективные фотосенсибилизаторы в ФДТ.

Относительно высокий квантовый выход триплетного состояния отличает бискарбоцианиновые красители от многих цианиновых красителей, для которых низкий квантовый выход триплетного состояния обусловлен эффективно протекающим процессом внутренней конверсии (**ВК**) по механизму быстрой фотоизомеризации вокруг длинной полиметиновой цепочки.

Было изучено взаимодействие красителей БКЦ1 с альбумином и ДНК. Прямое фотовозбуждение раствора БКЦ 1 (5×10^{-5} М) в этаноле в отсутствие кислорода приводит к образованию короткоживущего триплетного состояния красителя с максимумами T–T поглощения при 680 и 1000 нм (Рисунок 10, 11). Гибель триплета происходит по реакции первого порядка, время жизни триплетного состояния составляет (600 ± 60) мкс.

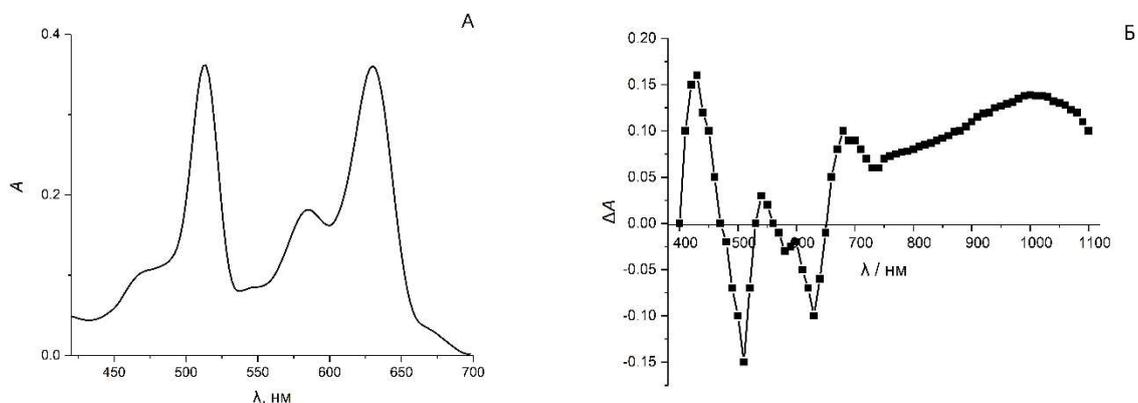


Рисунок 9 - А – синглетный спектр красителя БКЦ1; Б - Спектр триплетного состояния БКЦ1 (5×10^{-7} М), сенсibilизированное заселение триплетного состояния через антрацен (5×10^{-5} М) возбуждение ксеноновой лампой, фильтры УФС-6 (350-390 нм) в EtOH.

Существенно больший выход триплетного состояния зарегистрирован при прямом фотовозбуждении растворов красителя в комплексе с биополимерами.

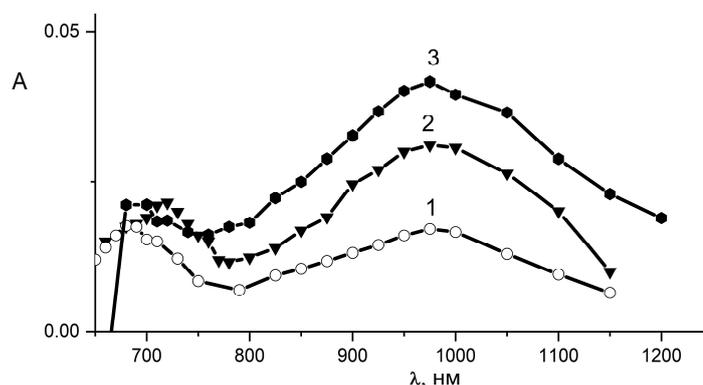
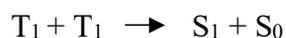


Рисунок 10 - Спектр триплетного состояния БКЦ1. 1. Спектр триплетного состояния красителя БКЦ1 в EtOH. 2. Спектр триплетного состояния красителя БКЦ1 в комплексе с альбумином $c = 5 \times 10^{-4}$ моль/л при прямом фотовозбуждении (ЖС-10 + СЗС-23). 3. Спектр триплетного состояния красителя БКЦ1 в комплексе с ДНК $c = 5 \times 10^{-5}$ моль/л при прямом фотовозбуждении (ЖС-10 + СЗС-23).



Кислород является эффективным тушителем триплетных состояний красителя, что подтверждает природу триплет-триплетного поглощения (Рисунок 11).

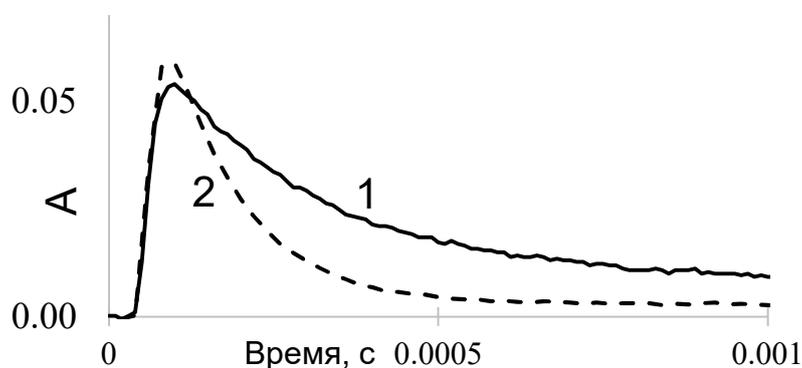
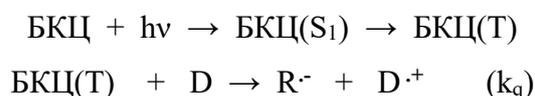


Рисунок 11 - Тушение T-состояния красителя кислородом в EtOH. 1. Кинетика гибели триплета красителя БКЦ1 (8×10^{-6} М) без кислорода воздуха. 2. Кинетика гибели триплета красителя БКЦ1 (8×10^{-6} М) в присутствии кислорода (3×10^{-6} М).

Была определена константа тушения триплетного состояния красителя БКЦ1 кислородом по механизму переноса энергии с образованием синглетного кислорода: $k_q = 2.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Установлены спектрально-кинетические характеристики процесса тушения триплетного состояния бискарбацианинового красителя БКЦ1 в EtOH N,N-диметиланилином (ДМА), 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксидом (ТЕМРО),



Импульсное фотовозбуждение растворов бискарбоцианиновых красителей БКЦ1,2 (2×10^{-6} М) в органических растворителях приводит к заселению триплетного состояния с максимумом Т-Т поглощения в области 1000 нм. Гибель триплетного состояния является экспоненциальной с константой $k = 1,15 \times 10^3 \text{ с}^{-1}$ только при очень малой концентрации красителя в триплетном состоянии. Отклонение от кинетики первого порядка при более высоких концентрациях обусловлено дезактивацией триплетного состояния в результате Т-Т аннигиляции, происходящей со скоростью, сопоставимой с диффузионной константой бимолекулярной реакции в этаноле. Константа тушения триплетного состояния БКЦ1 донором электрона ДМА в спиртовом растворе составила $k_q = 2.3 \times 10^9 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ по механизму переноса электрона (Рисунок 12).

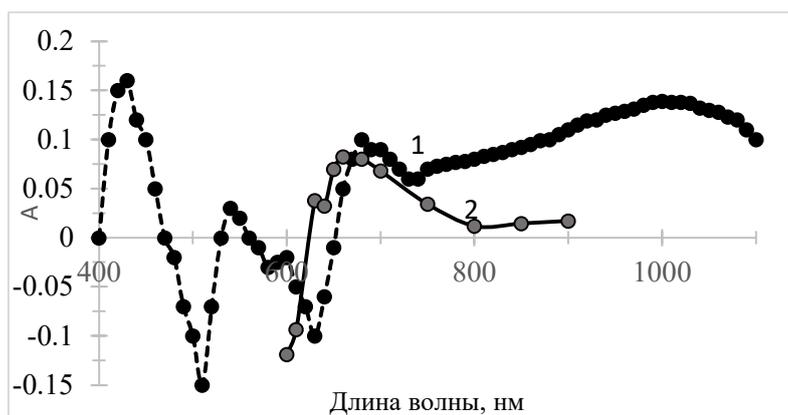


Рисунок 12 - 1. Триплет-триплетный спектр БКЦ1 (триплет-триплетный перенос энергии от антрацена на краситель, при фотовозбуждении через фильтр УФС6) в EtOH. 2. Спектр анион-радикала красителя БКЦ1 при добавлении N,N-диметиланилина в EtOH.

Невысокая константа триплет-триплетного переноса от антрацена на краситель позволяет сделать вывод о близком расположении уровней триплетной энергии антрацена и БКЦ1.

Была исследована реакционная способность триплетных состояний бискарбоцианинового красителя БКЦ1 и процесс образования стабильных фотопродуктов красителя при взаимодействии с нитроксильным радикалом 4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперином-1-оксидом (TEMPO). Обескислороженный раствор БКЦ (1.5×10^{-6} М) в этаноле в присутствии избытка TEMPO (1×10^{-3} М) облучался красным светом. После фотооблучения системы в спектре поглощения полностью исчезает спектр БКЦ1 с двумя максимумами при 502 и 618 нм (БИС), и появляется спектр с одним максимумом при 544 нм (М), который характерен для поглощения карбоцианиновых красителей. Наблюдаемое явление означает разрушение одной из полиметиновых цепей в БКЦ и исчезновение сопряжения между хромофорами в БКЦ. Разрушение хромофорной системы БКЦ в присутствии нитроксильного радикала происходит только при фотооблучении, т.е. в этот процесс вовлечены молекулы красителя в триплетном состоянии.

При добавлении нитроксильного радикала в концентрациях $(1-100) \times 10^{-6}$ М наблюдали уменьшение времени жизни триплетного состояния. Из зависимости кинетики гибели триплетного состояния красителя при различных концентрациях TEMPO была вычислена константа тушения триплета красителя радикалом $k_q = 1,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Гибель триплета красителя в присутствии TEMPO происходит по реакции переноса электрона на триплет красителя и по реакции ускорения интеркомбинационной конверсии под действием парамагнитной частицы. Реакция фотопереноса электрона приводит к фоторазложению БКЦ1.

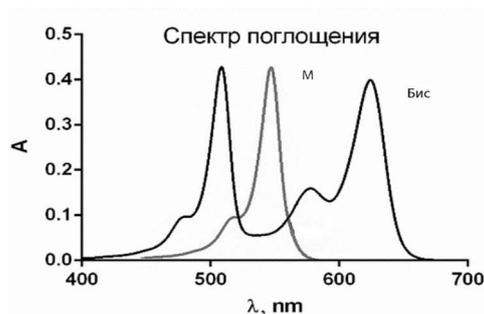


Рисунок 13 - Спектры красителя БКЦ1 (бис) и продукта распада М.

В результате переноса электрона между нитроксильным радикалом и триплетом БКЦ происходит необратимая окислительно-восстановительная реакция, которая приводит в конечном счете к образованию структуры несимметричного (индол-бензтиазол) карбоцианинового красителя, который характеризуется спектром поглощения с максимумом при 544 нм и плечом колебательной структуры при 510 нм (Рисунок 13).

Для характеристики внутриклеточной локализации БКЦ1 в органеллах был использован метод конфокальной флуоресцентной микроскопии. В клетки линии НСТ 116 клеток были введены следующие красители для контрастирования: LysoTracker Green, ER-Tracker Green, Dihydrorhodamine 123 и Hoechst 33342. Флуоресцентный сигнал от БКЦ1 зарегистрирован главным образом в цитоплазме клеток и перекрывается с сигналами от всех перечисленных клеточных маркеров (Рисунок 14). Наибольшее перекрытие наблюдается с сигналом от DHR123, что свидетельствует о высокой концентрации красителя в митохондриях клеток. Следовые количества БКЦ были обнаружены в ядрах клеток, но связывание очень слабое. Можно сделать вывод, что краситель проникает в клетку и локализуется преимущественно в цитоплазме.

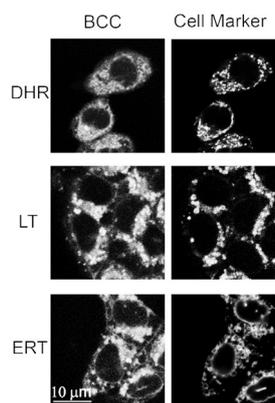


Рисунок 14 – Конфокальная микроскопия локализации БКЦ1 ($\lambda_{ex} = 514 \text{ нм} / \lambda_{em} = 650\text{--}700 \text{ нм}$ [$5 \times 10^{-7} \text{ М}$]) с маркером эндоплазматической сети ER-Tracker Green (ERT) ($\lambda_{ex} = 488 \text{ нм} / \lambda_{em} = 510\text{--}570 \text{ нм}$ [$5 \times 10^{-6} \text{ М}$]) и лизосомального маркера LysoTracker зеленый DNA-26 (LT) ($\lambda_{ex} = 488 \text{ нм} / \lambda_{em} = 500\text{--}580 \text{ нм}$ [$5 \times 10^{-6} \text{ М}$]) и митохондриального маркера дигидрородамин 123 (DHR) ($\lambda_{ex} = 488 \text{ нм} / \lambda_{em} = 510\text{--}570 \text{ нм}$ [$5 \times 10^{-6} \text{ М}$]) в живых клетках линии HCT116;

Два положительных заряда и значительная гидрофобность, обусловленная наличием двух сопряженных полиметиновых цепей в структуре БКЦ1, являются основой наблюдаемого эффективного проникновения в клетки. Была проведена оценка фотосенсибилизационности БКЦ1 по отношению к клеткам аденокарциномы кишечника человека HCT116. Результаты показали высокую световую токсичность ($IC_{50} = 1 \times 10^{-6} \text{ М}$) бискарбацианиновых красителей *in vitro*.

Заключение

В рамках представленной диссертационной работы были охарактеризованы процессы комплексообразования с биомакромолекулами серии новых гептаметиновых красителей. Установлены значения константы связывания красителей ИКЦ2,3 с альбумином. Показано, что комплексообразование цианиновых красителей с альбумином происходит предпочтительно благодаря гидрофобным взаимодействиям в умеренно-полярном кармане между сайтами связывания ПА и ША. В работе было установлено, что после образования первичного комплекса с диффузионной константой, происходит оптимизация структуры комплекса. В процессе комплексообразования происходит торможение процессов изомеризации за счет повышения жесткости структуры молекулы, что приводит к понижению вклада внутренней конверсии в процессы деградации энергии возбужденного состояния. Установленные физико-химическими методами параметры комплексов ЦК-альбумин коррелируют с полученными при помощи докинга.

При комплексообразовании бискарбацианинового красителя БКЦ1, способного переходить в триплетное состояние при прямом фотовозбуждении, под действием света

происходит реакция быстрого фотопереноса электрона с образованием полувосстановленной формы красителя. Данное утверждение было подтверждено на серии модельных экспериментах с образованием анион радикала с донором электрона.

В дальнейшем показано, что БЦК1 хорошо накапливается в клетках и локализуется преимущественно в цитоплазме клеток НСТ116, продемонстрирован фотодинамический эффект действия красителя в микромолярных концентрациях на клетках.

Выводы:

1. Охарактеризована серия новых гептаметиновых индоцианиновых красителей (ИКЦ):
 - А) Показано, что комплексообразование с альбумином происходит в основном посредством гидрофобного взаимодействия полиметиновой цепи с гидрофобным сайтом связывания альбумина, преимущественно доменами IA и IIIВ. Установлены квантовые выходы процессов дезактивации синглетно-возбужденного состояния красителей ИКЦ1-3.
 - Б) Зарегистрирован спектр триплетного состояния исследуемых соединений методом Т-Т переноса энергии. Исследован механизм дезактивации синглетно-возбужденного состояния красителей ИКЦ1-3 в комплексах с белками.
2. Определены константы связывания ЦК с белками крови (альбумин, альфа-фетопроtein). По кинетике гибели флуоресценции установлено существование по меньшей мере двух типов комплекса краситель-белок.
3. Доказано, что образование комплекса с биополимерами приводит к увеличению жесткости структуры молекулы, подавлению колебательной релаксации.
4. Полу жестким докинггом установлена конформация комплекса краситель-альбумин.
5. Методом молекулярной динамики показана решающая роль гидрофобных взаимодействий в ориентации молекулы между субдоменами альбумина IB и IIIА.
6. Методом импульсного фотолиза доказано, что взаимодействие триплетного состояния БКЦ с тушителями (кислородом, нитроксильными радикалами (ТЕМРОL)) приводит к тушению триплетного состояния с константой $k_q = 2.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (по механизму переноса энергии) и с константой $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (по механизму переноса электрона и ускорения интеркомбинационной конверсии).
7. Изучение процессов, протекающих при прямом фотовозбуждении систем, содержащих комплекс красителя и биополимера, показал фотоперенос электрона между молекулой БКЦ и альбумином.
8. На серии БКЦ продемонстрировано образование анион-радикала в присутствии доноров электрона. При добавлении к раствору красителя N,N-диметил-анилина, аскорбиновой кислоты, белка происходило образование долгоживущей частицы, а спектр получаемых интермедиатов смещался на 15-20 нм в коротковолновую область.
9. На раковых клетках НСТ116 продемонстрирована локализация фотосенсибилизатора БКЦ, показан фотодинамический эффект по образованию супероксид-аниона после облучения красным светом.
10. Расположение красителя в центре связывания IA и IIIВ альбумина определяет близость красителя к ароматическим аминокислотам белка и эффективность реакции фотопереноса электрона.

Результаты работы опубликованы в следующих рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК:

- [1] Radchenko A. Photoactivated biscarbocyanine dye with two conjugated chromophores: complexes with albumin, photochemical and phototoxic properties / A. Radchenko, A. A. Kostyukov, A. Markova, A. A. Shtil, T. D. Nekipelova, I. E. Borissevitch, V. A. Kuzmin // *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2019. Vol. 18. P. 2461. (Scopus)
- [2] Костюков А.А. Взаимодействие триплетного состояния бискарбоцианинового красителя с нитроксильным радикалом / Костюков А.А., Некипелова Т.Д., Борисевич Ю.Е., Кузьмин В.А. // *Химия высоких энергий*. 2019. Т. 53. № 1. С. 76. (Scopus)
- [3] Радченко А.Ш. Супертушение флуоресценции интеркалированного в ДНК цианинового красителя при комплексообразовании с полиакрилатом золота / Радченко А.Ш., Абзаева К.А., Корман Д.Б., Островская Л.А., Костюков А.А., Шибеева А.В., Бирюкова Ю.К., Погонин В.И., Некипелова Т.Д., Кузьмин В.А. / *Химия высоких энергий*. 2018. Т. 52. № 3. С. 242. (Scopus)
- [4] Костюков А.А. Комплексы альфа-фетопротейна и сывороточного альбумина с бискарбоцианиновым красителем / Костюков А.А., Позднякова Н.В., Шевелев А.Б., Радченко А.Ш., Головина Г.В., Климович О.Н., Штиль А.А., Debora C.K.C., Pablo J.G., André L.S.P., Lucimara P.F., Andre M.A., Борисевич Ю.Е., Кузьмин В.А. // *Химия высоких энергий*. 2017. Т. 51. № 3. С. 248. (Scopus)
- [5] Pavanelli R. Phototransformation of cyanine dye with two chromophores. effects of oxygen and dye concentration / R. Pavanelli, L. S. Amado, L. B. Mostao, A. A. Kostyukov et al. // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. — 2017. Vol. 349. P. 42. (Scopus)
- [6] Костюков А.А. Триплетные состояния комплексов бис-карбоцианинового красителя и альбумина / Костюков А.А., Некипелова Т.Д., Радченко А.Ш., Головина Г.В., Климович О.Н., Штиль А.А., Codognato D.C.K., Goncalves P.J., Борисевич Ю.Е., Кузьмин В.А. / *Химия высоких энергий*. 2017. Т. 51. № 2. С. 161. (Scopus)
- [7] Kuzmin V. A. Complex formation of albumin with tricarbocyanine dyes containing phosphonate groups / V. A. Kuzmin, T. D. Nekipelova, T. A. Podrugina, A. A. Kostyukov et al. // *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2016. Vol. 15, №. 11. P. 1377. (Scopus)
- [8] Кузьмин В.А. Новые фосфонатзамещенные трикарбоцианины и их взаимодействие с бычьим сывороточным альбумином / Кузьмин В.А., Подругина Т.А., Некипелова Т.Д., Дорошенко И.А., Проскурнина М.В., Головина Г.В., Радченко Е.В., Костюков А.А., Темнов В.В., Матвеева Е.Д., Палюлин В.А., Зефилов Н.С. / *Доклады Академии наук*. - 2016. Т. 470. № 3. С. 293. (Scopus)
- [9] Кузьмин В.А. Спектрально-кинетические характеристики фотовозбужденных комплексов альбумина и индотрикарбоцианинового красителя с фосфонатными заместителями / Кузьмин В.А., Головина Г.В., Костюков А.А., Некипелова Т.Д., Подругина Т.А., Кривелева А.С., Матвеева Е.Д., Проскурнина М.В., Зефилов Н.С. // *Химия высоких энергий*. 2016. Т. 50. № 4. С. 331. (Scopus)