

УТВЕРЖДАЮ:

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук

д.х.н., профессор И.Н. Курочкин



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института
биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Диссертация «Фотохимия гептаметиновых цианиновых, триметиновых бисцианиновых красителей и их комплексов с биомакромолекулами» выполнена Костюковым Алексеем Александровичем в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

В период подготовки диссертации соискатель Костюков Алексей Александрович работал в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук в должности научного сотрудника.

В 2010 году окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет. С 30 октября 2010 года по 7 октября 2013 обучался в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук. по специальности 03.01.03 - «молекулярная биология», работал в лаборатории биологических микрочипов, занимался синтезом флуоресцентно-меченых нуклеиновых кислот.

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано №148 15 октября 2020 года Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор Кузьмин Владимир Александрович заведующий лабораторией процессов фотосенсибилизации

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук. Тема диссертационной работы и научный руководитель утверждены на заседании ученого совета ИБХФ РАН от 29 ноября 2018 г., протокол №34.

Рецензент: д.х.н., заведующий лабораторией фотобионики Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук Лобанов А.В.

В ходе обсуждения были заданы следующие вопросы:

1. Д.х.н. проф., г.н.с Трофимов А.В. «Насколько на ваш взгляд связана разница время жизни флуоресценции в комплексе с альбумином для красителей с различной длиной полиметиновой цепи?»
2. К.б.н., н.с., Климович М.А. «Почему вы наблюдали столь существенную разницу в величине константы тушения триплетного состояния для красителя БКЦ4, полученной методом импульсного фотолиза в органических растворителях и фосфатносолевом буфере в комплексе с белком?»
3. Н.с. Морозов В.Н.: «Почему в клеточных экспериментах использована линия НСТ116?»
4. Н.с. Егоров А.Е.: «В ходе экспериментов по анализу кинетики комплексообразования было показано что происходит образование первичного комплекса, который затем перестраивается с образованием нескольких видов комплексов. Как вы оцениваете происходящий процесс?»

Актуальность работы. Флуоресцентное маркирование как неинвазивный метод диагностики находит все более широкое применение в медицинской практике наряду с традиционным радиоизотопным маркированием. Так, например, в практике медицинских исследований анализ последовательности нуклеиновых кислот с использованием гибридизационного метода нашел применение для обнаружения и идентификации возбудителей заболеваний. Оптимизация этого процесса показала, что важными для чувствительности, точности и достоверности являются флуоресцентные характеристики и оптический диапазон возбуждения. Среди существующих флуорофоров особое место занимают цианиновые красители. Несмотря на то, что соединения являются труднодоступными для получения, они обладают непревзойдённо высоким коэффициентом экстинкции, хорошим квантовым выходом флуоресценции и малой полушириной полосы в спектрах возбуждения и поглощения. Так, например, молекулы, маркированные

индодикарбоцианиновыми красителями, могут быть зарегистрированы с чрезвычайно высокой чувствительностью, вплоть до 3×10^{-18} М, что соответствует 2×10^6 молекул. Использование карбоцианиновых красителей позволяет в несколько раз повысить чувствительность детекции, благодаря тому что уровень шумов в ИК-диапазоне существенно ниже, чем в видимом и УФ диапазоне.

Таким образом остается актуальным запрос на создание эффективной флуоресцентной метки для медицинского и биологического применения, обладающей высокой фотостабильностью, отличными оптическими и флуоресцентными свойствами, высоким сродством к биомакромолекулам и способностью к комплексообразованию с биомолекулами. В настоящее время активный поиск аналогов кардиограина с улучшенными фото-физическими свойствами широко представлен в литературе. Однако, наименее изученным классом соединений среди карбоцианинов являются структуры, содержащие в своей молекуле два хромофора.

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.

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;

Научная новизна работы: в рамках диссертационной работы были установлены спектрально-кинетические характеристики серии новых индокарбоцианиновых 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 бискарбоциановых красителей для фотодинамической терапии. Методом импульсного фотолиза зарегистрировано триплетное состояние молекул водорастворимых индокарбоцианиновых 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.

Теоретическая и практическая значимость работы

В рамках диссертационной работы были установлены спектрально-кинетические характеристики серии новых индокарбоцианиновых 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 бискарбоциановых красителей для фотодинамической терапии. Методом импульсного фотолиза зарегистрировано триплетное состояние молекул водорастворимых индокарбоцианиновых 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.

Личное участие автора в получении научных результатов

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. Пальюлин, 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.

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность результатов обусловлена применением методики прямого осциллографирования регистрируемых сигналов интермедиатов. Корректность применяемой методики для используемых физико-химических 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 получена 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.

Ценность научных работ соискателя подтверждается многократным участием автора во всероссийских и международных конференциях: «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; XXXI Симпозиум Современная химическая физика, Туапсе, Россия, 16-25 сентября 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), 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.

Перечень работ, опубликованных по теме диссертации:

[1] Photoactivated biscarbocyanine dye with two conjugated chromophores: complexes with albumin, photochemical and phototoxic properties / A. Radchenko, A. A. Kostyukov, A. Markova et al. // *Photochemical and Photobiological Sciences*. — 2019. Т.18 — P. 2461.

[2] 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.

[3] 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., Шibaева А.В., и др. / *Химия высоких энергий*. 2018. Т. 52. № 3. С. 242.

[4] Комплексы альфа-фетопротеина 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., Debra 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.

[5] Phototransformation of cyanine dye with two chromophores. effects of oxygen and dye concentration / R. Pavanelli, L. S. A, L. B. Mostao, A. A. Kostyukov et al. // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. — 2017. — Vol. 349. — P. 42.

[6] Триплетные состояния комплексов бис-карбоцианинового красителя и альбумина / Костюков А.А., Некипелова Т.Д., Радченко А.Ш., и др. / *Химия высоких энергий*. 2017. Т. 51. № 2. С. 161.

[7] 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, no. 11. — P. 1377.

[8] 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., Зефирова Н.С. / Доклады Академии наук. 2016. Т. 470. № 3. С. 293.

[9] 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., Зефирова Н.С. / Химия высоких энергий. 2016. Т. 50. № 4. С. 331

Кандидатская диссертация «Фотохимия гептаметиновых цианиновых, триметиновых бисцианиновых красителей и их комплексов с биомacroмолекулами» является законченным квалификационным исследованием, направленным на изучение фотохимических свойств цианиновых красителей в комплексах с биомacroмолекулами. Работа выполнена с применением современных методов химической физики (времяразрешенный счет единичных фотонов, лазерный импульсный фотолиз, остановленная струя, конфокальная флуоресцентная микроскопия). Данные, полученные этими методами, кинетически обработаны, что позволило сделать ряд выводов о вкладе различных компонентов биомacroмолекул в структуру комплекса и их фотохимические свойства. Результаты работы полностью представлены в публикациях. Выводы из работы полностью основаны на результатах, логично вытекают из них и дают представление о наиболее значимых достижениях соискателя.

Диссертация написана самостоятельно, обладает внутренним единством, содержит новые научные данные. Достоверность результатов подтверждена корреляцией полученных практическими методами данных с теоретическими заключениями. Ценность научных работ отражена в 9 статьях в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК, 3 из которых в иностранных журналах. 10 тезисах докладов на конференциях и симпозиумах.

Диссертация Костюкова Алексея Александровича «Фотохимия гептаметиновых цианиновых, триметиновых бисцианиновых красителей и их комплексов с биомacroмолекулами» по теме, постановке задач, методам исследования и полученным результатам соответствует специальности 02.00.04 – физическая химия (химические науки).

Диссертационная работа Костюкова Алексея Александровича «Фотохимия гептаметиновых цианиновых, триметиновых бисцианиновых красителей и их

комплексов с биомакромолекулами» соответствует требованиям п.9 – 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 23 сентября 2013 года, с изменениями Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 года №335 в редакции Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 года №748, и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.04 – физическая химия.

Присутствовало на заседании 13 человек, из них докторов наук 7.

Результаты голосования

«за» - 13,

«против» - 0,

«воздержалось» - 0.

Председатель семинара д.б.н.,

Секретарь семинара к.б.н.



Островский М.А.

Шибасева А.В.