

## Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу

**Костюкова Алексея Александровича** на тему: «Фотохимия гептаметиновых цианиновых, триметиновых бисцианиновых красителей и их комплексов с биомакромолекулами», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.04 – физическая химия.

**Актуальность темы диссертации.** Актуальность работы прежде всего заключается в необходимости создания флуорофоров и фотосенсибилизаторов, обладающих заданной функциональностью и способностью к накоплению в клетках патологического процесса.

Актуальность решаемой задачи усиливается также тем, что несмотря на существование большого числа красителей, обладающих близким к 100% квантовым выходом триплетного состояния (красители: роза бенгальская, эритрозин, эозин), фотосенсибилизаторы обладают высокой темновой токсичностью. Применяемые в практике фотосенсибилизаторы в основном действуют по механизму переноса энергии триплетного состояния на молекулу кислорода, что является низкоэффективным процессом ввиду низкой концентрации свободного кислорода в биологических системах. Введение в практику фотосенсибилизаторов, способных к созданию окислительного стресса является первостепенной задачей развития фотодинамической терапии (ФДТ).

Создание более эффективных лекарств для флуоресцентной медицинской визуализации в области видимого и ближнего ИК диапазона является актуальной задачей, поскольку единственным допущенным для применения цианиновым красителем является кардиогрин, обладающий низким квантовым выходом флуоресценции, высокой склонностью к агрегации и низкой растворимостью.

**Достоверность и степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Проведенное диссертационное исследование опирается на современные представления, разработки и положения, которые применяются в физической химии, фотохимии органических красителей. Применялись также методы численного моделирования и квантово-механические расчеты взаимной ориентации молекул исследуемых красителей и альбумина. Представленные результаты были отмечены дипломами за лучшую работу на симпозиумах «Новые материалы и технологии», «Современная химическая физика».

### **Научная новизна исследования.**

В представленной работе получены и охарактеризованы спектрально-кинетические характеристики серии гептаметиновых и бискарбоцианиновых красителей в комплексах с биомакромолекулами.

1. Впервые получены константы связывания исследуемой панели красителей с альбумином и химерными белками.
2. Показано влияние комплексообразования на флуоресценцию красителей, подтвержден вклад гидрофобных взаимодействий в структуру комплекса.
3. Продемонстрирована важность процесса колебательной релаксации в процессах деградации энергии возбужденных состояний красителя, влияния объема заместителей в центре молекулы.
4. Продемонстрирована способность к переходу в триплетное состояние бискарбоцианиновых красителей под действием прямого фотооблучения в комплексах с биомакромолекулами.
5. Циклом клеточных работ показана эффективность накопления и распределения исследуемых соединений в объеме клетки серии НСТ116.

### **Содержание работы.**

Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов, списка литературы.

Во **введении** дано обоснование актуальности научного направления по изучению фотохимии цианиновых красителей, сформулированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов и апробация результатов работы.

В **первой главе** дается обзор литературы по тематике диссертации, описываются проблемы, связанные с проведением оценок фотохимических свойств красителей для применения в качестве реагентов для ФДТ и флуоресцентной визуализации.

Во **второй главе** приводится описание материалов и методов, применяемых для получения данных о фотохимической активности исследуемых красителей. Представлены основные сведения о применяемом оборудовании, методиках экспериментальных исследований, стандартных подходов к вычислению основных характеристических параметров исследуемых соединений.



Описан комплекс экспериментальных методов, использованных для исследования кинетики процессов релаксации возбужденных состояний, и, соответственно, изучения реакционной способности фотохимически-активных соединений. Показана возможность создания прогностической модели для столь широко-модифицируемой группы соединений как цианиновые красители, что является большим подспорьем для их модификации с целью получения молекул с заданными свойствами.

В **третьей главе** приводятся основные результаты работы и их обсуждение.

Диссертация Костюкова А.А. посвящена исследованию быстрых фотохимических процессов в молекулах цианиновых красителей и их нековалентных комплексов с биомакромолекулами.

Для гептаметиновых цианиновых красителей были получены спектральные характеристики комплексов с биомакромолекулами, подтверждено вхождение и накопление в клеточных структурах. Методом однофотонного счета с использованием лазерного фотовозбуждения в пикосекундной области измерены времена жизни флуоресценции полиметиновых красителей в растворах органических растворителей, в воде и для комплексов с альбумином. Экспериментально получены доказательства наличия 2-экспоненциальной зависимости кинетики гибели синглетного возбужденного состояния, что свидетельствует об образовании двух типов комплексов с различной молекулярной жесткостью. Установлено, что большее время жизни флуоресценции соответствует более прочному комплексу. Получены основные фотохимические характеристики исследуемых соединений (кв. выход флуоресценции, молярная экстинкция, дана оценка квантовому выходу триплетного состояния). Показана эффективность в клеточном накоплении применяемых красителей на линии раковых клеток НСТ116.

Способность поглощать свет в области «терапевтического окна» для цианиновых красителей хорошо согласуется с требованиями к применяемым в ФДТ фотосенсибилизаторов и флуорофоров для оптической медицинской визуализации. Исследование процессов комплексообразования для красителей является необходимым условием их практического применения, ввиду того, что это является важным критерием при выборе лидерного соединения. Реакционная способность светоактивных соединений, способных к участию в реакции переноса электрона, приводит к образованию анион-радикала красителей, что является основанием для применения их в качестве новых фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии. Актуальность работы обусловлена

способностью цианиновых красителей селективно накапливаться в раковых клетках, что делает их перспективными фотосенсибилизаторами и флуорофорами.

В диссертационной работе проведена серия экспериментов с целью установления закономерностей взаимосвязи между структурой и реакционной способностью полиметиновых красителей с двумя сопряженными хромофорами в сложных молекулярно-организованных системах, образованных в виде комплексов с молекулами белков. Основными фотохимическими процессами с участием комплексов бискарбоцианиновых красителей и биомакромолекул, являются сверхбыстрые фотохимические реакции фотопереноса электрона и переноса энергии с участием синглетно-возбужденных и триплетных состояний красителей. При реализации этих целей были проведены эксперименты прямой регистрации спектрально-кинетических характеристик короткоживущих интермедиатов (триплетных состояний, радикалов фотосенсибилизаторов) в быстрых фотохимических процессах комплексов бисполиметиновых красителей и биомакромолекул методом импульсного фотолиза, исследована кинетика гибели флуоресценции комплексов методом счета единичных фотонов.

Для бискарбоцианиновых красителей были установлены спектрально-кинетические характеристики триплетных состояний методом импульсного фотолиза с применением триплет-триплетного переноса энергии и исследования кинетики процессов тушения триплетов нитроксильными радикалами и молекулярным кислородом, при взаимодействии с которым образуется синглетный кислород. Важной характеристикой реакционной способности триплетного состояния является положение уровня триплетной энергии, верхняя оценка которого была выполнена при помощи сенсibilизированного заселения триплетного уровня энергии красителя с полиароматического углеводорода. Исследованы процессы комплексообразования цианиновых красителей, их флуоресценции, быстрого фотопереноса электрона от донора на триплетное состояние красителя. При взаимодействии фотосенсибилизатора с белком происходит встраивание молекулы красителя в альбумин. Результатом этого является усиление жесткости структуры красителя в комплексе и уменьшение роли колебательной релаксации, как пути дезактивации молекулы, и при этом возрастает роль интеркомбинационной конверсии и флуоресценции. При комплексообразовании происходит увеличение квантового выхода триплетного состояния красителя. Комплексообразование красителя и альбумина приводит к увеличению ( $\approx 20\%$ ) времени жизни триплетного состояния в комплексе красителя с белком, что обусловлено экранированием структуры красителя в триплетном



состоянии от молекул тушителей и примесей (остаточные следы кислорода). Доставка фотосенсибилизатора БКЦ в клетку сильно зависит от комплексообразования красителя и основного транспортного белка альбумина. Исследовано взаимодействие бискарбоцианинового красителя с химерным белком, являющимся специфичным доставщиком связанных им соединений к раковым клеткам.

Возможные взаимодействия между молекулой БКЦ и ЧСА были проанализированы с использованием метода молекулярного докинга. Разница в расчетных энергиях связи различных режимов связывания, предложенных докингом, которая не превышает 1.5 ккал/моль, указывает на то, что они практически одинаково возможны и, предположительно, возможен переход между ними.

Методом конфокальной флуоресцентной микроскопии даны основные параметры внутриклеточной локализации бискрасителя в раковых клетках НСТ116. Продемонстрирована эффективность накопления и распределения между органеллами клетки исследуемого красителя. Дана оценка влияния липофильности структуры красителя на его поведение внутри клетки.

**Выводы** четко и вполне обосновано характеризуют полученные в диссертационной работе результаты. Соискатель достаточно корректно использует научные методы обоснования полученных результатов, выводов и рекомендаций.

По теме диссертационной работы в период 2016-2019 гг. опубликовано 9 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень Web of Science и Scopus, одна из которых в журнале, входящем в Q1 рейтинга научных журналов. Получен патент на изобретение, являющийся прямым практическим применением исследуемых соединений, поскольку прогресс в ФДТ злокачественных опухолей зависит от способности фотосенсибилизаторов сочетать максимальное цитотоксическое воздействие на клетки опухоли с отсутствием повреждений здоровых клеток и окружающих опухоль нормальных тканей организма.

#### **Замечания по диссертационной работе в целом**

1. В диссертации отсутствует критический анализ фотосенсибилизирующей активности цианиновых красителей, в структуру которых введены: тяжелый атом, парамагнитная частица (фрагмент стабильного радикала) и фрагменты, существенно повышающие жесткость структуры красителя.

2. В диссертации недостаточно приведено сравнений с работами по классическим тетрапирролам для ФДТ, выполненные под руководством Prof. Avigdor Shertz (Weizmann Institute of Science, Израиль).
3. Представленные доказательства фотопереноса электрона от ароматического амина требуют дополнительного подтверждения по анализу кинетики образования анион-радикала красителя.
4. Полученные оценки фотосенсибилизирующей активности для родственных кардиогрину красителей в комплексе с альбумином являются приблизительными и требуют дополнительного уточнения методом фемтосекундного импульсного фотолиза.
5. Времена жизни флуоресценции часто приводятся в пикосекундах или в наносекундах, что не всегда оправдано.

Отмеченные недостатки не снижают высокий уровень выполненных исследований и не влияют на общую оценку научного уровня диссертации, ее научной новизны и практической значимости.

### **Заключение**

Диссертация соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, она хорошо оформлена и выполнена самостоятельно на высоком научном уровне. Автореферат диссертации составлен по установленной форме и полностью отражает основное содержание диссертации. Убедительно сформулированы актуальность, цель, задачи исследования, научная новизна и практическая значимость.

Диссертационная работа А.А. Костюкова «Фотохимия гептаметиновых цианиновых, триметиновых бисцианиновых красителей и их комплексов с биомакромолекулами» по актуальности, новизне, практической значимости и уровню проведенных исследований работа соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительством Российской Федерации от 24 сентября 2013 г №842 (Ред.от 01.10.2018, с изм от 26.05.2020), так как является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические и практические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области фотохимии цианиновых красителей и их практического применения для фотомедицины.

Автор диссертации Костюков Алексей Александрович заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.04 – физическая химия.

Официальный оппонент:

Доктор химических наук, профессор,

заведующий лабораторией гетерогенного катализа

Корчак Владимир Николаевич

15 января 2021



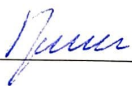
Место работы: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова  
Российской академии наук

Почтовый адрес: 119991, ГСП-1, Москва ул. Косыгина, дом 4, Федеральный  
исследовательский центр химической физики РАН

e-mail: korchak@chph.ras.ru

телефон: +7 (495) 939-71-68

Подпись В.Н. Корчака заверяю



Зам. Директора ФИЦ ХФ РАН по научной  
работе М.В. Гришин.

