

На правах рукописи



Егоров Антон Егорович

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК
И ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ФОТОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ С
УЧАСТИЕМ КОМПЛЕКСОВ ЦИАНИНОВЫХ И ПОРФИРИНОВЫХ
КРАСИТЕЛЕЙ И БИОМАКРОМОЛЕКУЛ**

1.4.4. Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва

2023

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

Научный руководитель: **Костюков Алексей Александрович,**
кандидат химических наук

Официальные оппоненты: **Надточенко Виктор Андреевич,**
доктор химических наук, профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук

Ведущая организация: **Лощенов Виктор Борисович,**
доктор физико-математических наук, профессор, заведующий лабораторией лазерной биоспектроскопии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Институт общей физики им. А. М. Прохорова Российской академии наук».
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии» Российской академии наук

Защита диссертации состоится «___» _____ 2023 г. в 12⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета 24.1.038.01 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/ru/odissertacii/Диссертация%20Егорова%20Антон%20Егоровича/>
Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

24.1.038.01, кандидат химических наук



Мазалецкая Лидия Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Тетрапиррольные красители уже сейчас находят применение для лечения некоторых опухолевых заболеваний методом фотодинамической терапии (ФДТ). В процессе развития данного метода уже созданы несколько поколений фотосенсибилизаторов (ФС), в том числе на основе порфиринов и хлоринов. Другой класс красителей - бискарбоцианиновые красители (БКЦ), благодаря наличию интенсивной полосы поглощения в красной и ближней ИК областях спектра и способности образовывать возбужденные триплетные состояния представляют интерес в качестве потенциальных фотосенсибилизаторов. Преимуществом данных красителей является возможность настройки спектральных характеристик флуорофора варьированием длины хромофорной цепи. Одним из аспектов эффективного проведения ФДТ является генерация молекулой фотосенсибилизатора активных форм кислорода (АФК) при взаимодействии с молекулярным кислородом. Среди основных АФК можно выделить такие как синглетный кислород, супероксидный радикал и гидроксил радикал. Исследование фотохимических процессов с участием молекулы ФС, приводящих к образованию АФК является важным для оценки влияния строения фотоактивной молекулы на её фотохимические свойства. Изучение процессов переноса энергии, и переноса электрона, которые приводят к генерации АФК, позволяет улучшить понимание механизмов действия ФС.

Настоящая работа посвящена исследованию фотохимических свойств возбужденных состояний новых карборанилтетрапиррольных, бискарбоцианиновых и кетоцианиновых красителей и их комплексов с биомакромолекулами (БММ).

Важным аспектом действия ФС является доставка фотоактивной молекулы в клетку с помощью таких молекул-транспортеров как человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) и липопротейны низкой плотности (ЛПНП). Исследование процессов комплексообразования ФС с данными биомакромолекулами (БММ) представляется необходимым для оценки возможности потенциальной доставки красителя в клетку.

Кетоцианиновые красители представляют интерес благодаря способности образовывать возбужденные триплетные состояния и генерировать АФК, не только в качестве потенциальных фотосенсибилизаторов для биомедицинского применения, но и фотоинициаторов (ФИ) в процессах фотополимеризации. Особый интерес для 3D-печати представляет метод двухфотонной полимеризации, позволяющий изготавливать трёхмерные структуры с высоким разрешением. Для улучшения характеристик производимых изделий необходимо создание новых молекул-фотоинициаторов. Кетоцианиновые красители уже находят применение в технологии 3D-печати в качестве фотоинициаторов. Изменение структуры и фотохимических

свойств данных фотоактивных молекул может приводить к более быстрому и точному изготовлению трехмерных структур.

Степень разработанности темы исследования. Актуальной проблемой в ФДТ является поиск новых молекул - фотосенсибилизаторов. В процессе развития ФДТ было создано уже три поколения фотосенсибилизаторов. Данная работа связана с исследованием фотохимических свойств новых фотоактивных молекул, комбинирующих действие фотосенсибилизатора, и агента для бор-нейтронозахватной терапии. Другой проблемой при проведении ФДТ является гипоксия опухолей. В условиях выраженной гипоксии актуальным становится использование ФС, действующих преимущественно по первому типу. В данной работе проведено исследование возможности действия бискарбоцианинового красителя как ФС первого типа. Разработка новых фотоактивных молекул для использования в процессах фотополимеризации также является актуальной задачей. В данной работе исследованы фотохимические свойства нового кетоцианинового красителя для использования в аддитивных технологиях.

Целью настоящей диссертационной работы является исследование фотохимических свойств ряда новых тетрапиррольных, бискарбоцианиновых и кетоцианиновых красителей, изучение процессов деактивации возбужденных состояний в зависимости от строения молекулы, исследование процессов переноса энергии с участием возбужденного триплетного состояния красителя и молекулярного кислорода, а также процессов переноса электрона с участием возбужденного триплетного состояния и донора электронов, а также характеристика процессов комплексообразования с молекулами ЧСА и ЛПНП.

Для выполнения этой цели были **поставлены следующие задачи:**

1. Методами импульсного фотолиза установить спектрально-кинетические характеристики триплетных состояний тетрапиррольных, бискарбоцианиновых и кетоцианиновых красителей в органических растворителях и в комплексах с ЧСА.
2. Методами спектрофотометрии и спектрофлуориметрии охарактеризовать комплексообразование красителей с молекулами ЧСА и ЛПНП.
3. Установить влияние структуры молекулы тетрапиррольных красителей на фотохимические процессы в органических растворителях.
4. Определить влияние молекулярного окружения на роль различных путей деактивации возбужденных состояний молекул кетоцианиновых красителей.
5. Установить спектрально-кинетические характеристики продуктов процесса фотопереноса электрона с участием бискарбоцианиновых красителей в модельной системе с донором электрона.

Объектом исследования были выбраны тетрапиррольные, бискарбоцианиновые и кетоцианиновые красители и их комплексы с биомакромолекулами.

Предмет исследований: спектрально-кинетические свойства возбужденных синглетных и триплетных состояний красителей классов тетрапирролов, бискарбоцианинов и кетоцианинов и их комплексов с биомакромолекулами.

Научная новизна работы заключается в определении спектрально-кинетических характеристик синглетных и триплетных состояний ряда новых красителей класса тетрапирролов, бискарбоцианинов и кетоцианиновых красителей и их комплексов БММ. Охарактеризованы процессы переноса энергии и электрона с участием триплетных состояний данных веществ. Определены константы комплексообразования исследуемых веществ с молекулами ЧСА и ЛПНП. Установлены зависимости строения фотоактивных молекул и путей деактивации возбужденных состояний.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в том, что впервые были установлены спектральные и кинетические характеристики возбужденных состояний новых красителей тетрапиррольного, бискарбоцианинового и кетоцианинового классов. Были получены константы комплексообразования красителей с ЧСА и ЛПНП. Определена эффективность образования синглетного кислорода тетрапиррольными красителями. Установлен фотоперенос электрона с участием триплетного состояния бискарбоцианинового красителя в модельной системе с донором электрона и установлены спектрально-кинетические характеристики анион-радикала красителя. Показано увеличение эффективности образования синглетного кислорода кетоцианиновым красителем при введении метакрилатных заместителей.

Положения, выносимые на защиту:

1. Введение карборановых заместителей в тетрапиррольные красители позволяет сохранить флуоресцентные и фотосенсибилизирующие характеристики ($\Phi_{\Delta} > 0,5$) красителей.
2. Исследованные тетрапиррольные и бискарбоцианиновые красители образуют комплексы с молекулами ЧСА и ЛПНП с константой связывания $K_b \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$. В процессе комплексообразования наблюдается усиление флуоресценции, как результат увеличения жесткости молекулярной структуры красителя при встраивании в макромолекулу альбумина.
3. Бискарбоцианиновые красители вступают в реакцию фотопереноса электрона в системе с донором электрона (аскорбиновая кислота). В результате переноса электрона образуется анион-радикал красителя, который гибнет в процессе рекомбинации с константой скорости $2k = 1-2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.
4. Новое метакрилатное производное на основе бис-бензилиденциклопентанона демонстрирует повышенную генерацию синглетного кислорода и радикальных интермедиатов по сравнению с исходной незамещенной молекулой красителя. Новое

производное является более перспективным ФИ для использования в аддитивных технологиях по сравнению с исходной молекулой.

5. Исследованные карборанилтетрапиррольные красители демонстрируют цитотоксическое действие на опухолевые клетки НСТ116 *in vitro*.

Методология и методы исследования. В данной работе использованы различные спектральные методы, такие как спектрофотометрия, флуориметрия, спектрофлуориметрия высокого временного разрешения, импульсный и лазерный фотолиз.

Личный вклад автора. Автор принимал участие во всех этапах исследования, от постановки цели и задач исследования и постановки эксперимента до публикации результатов проделанной работы. Диссертант выполнил весь объем физико-химических исследований, занимался обработкой массива полученных данных. Работы с клеточными культурами выполнялись совместно с сотрудниками ФГБУН Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН А.В. Шибаевой и А.А. Марковой. Полученные результаты представлялись диссертантом на конференциях.

Степень достоверности полученных результатов. В работе широко использовались современные методы физико-химических исследований: спектрофотометрия, времяразрешенная флуориметрия в режиме счета единичных фотонов, флуоресцентная спектроскопия, лазерный и импульсный фотолиз. Повторность проведения экспериментов и статистическая оценка погрешности полученных результатов обеспечивала достоверность результатов.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы опубликованы в 7 статьях в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК, 3 тезисах докладов на конференциях и симпозиумах. Результаты работы были представлены на: Симпозиуме Современная химическая физика, Туапсе, Россия, 16-25 сентября 2019; Симпозиуме Современная химическая физика, Туапсе, Россия, 24 сентября – 4 октября 2021, Конференция химия, физика, биология: пути интеграции, Москва, 20–22 апреля 2022 года.

Связь работы с научными программами и проектами. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда по проекту № 18-13-00463 «Механизмы фотохимических процессов в комплексах полиметиновых красителей с двумя сопряженными хромофорами и белков».

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, и списка литературы, включающего 249 источников. Диссертация изложена на 125 страницах, включает 13 таблиц и 53 рисунков.

ОСНОВНОЕ 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 можно разделить на три части. В начале рассмотрены принципы действия фотосенсибилизаторов в ФДТ. Отдельно описаны достижения, связанные с созданием новых поколений фотосенсибилизаторов на основе тетрапиррольных красителей. Указаны особенности строения бискарбоцианиновых красителей и их фотохимические свойства. Далее рассмотрены проблемы доставки фотоактивных молекул в клетки. Рассмотрена структура таких биомакромолекул-транспортеров как альбумин и ЛПНП и описана их роль в доставке различных лигандов в клетки. В заключении раздела рассматриваются актуальные направления в области аддитивных технологий (3D-печати) и принципы и механизмы действия фотоинициаторов, а том числе кетоцианиновых, участвующих в процессах полимеризации.

Глава 2. Материалы и методы

Вторая глава содержит перечисление используемых веществ и реактивов, приведено описание экспериментальных методик (абсорбционная и люминесцентная спектроскопия, импульсный фотолиз, флуорометрия коррелированного по времени подсчета одиночных фотонов, конфокальная микроскопия, квантово-химические расчеты). Указаны способы обработки данных и используемые для расчетов формулы. В работе использованы тетрапиррольные красители (Рисунок 1, Рисунок 2), синтезированные в лаборатории тонкого органического синтеза ФГБУН ИНЭОС РАН, бискарбоцианиновые красителя были получены из коллекции ГОСНИИХИМФОТОПРОЕКТ (Рисунок 3), кетоцианиновые красители (Рисунок 4) были синтезированы в лаборатории фотополимеризации и полимерных материалов ФГБУН ИМХ РАН.

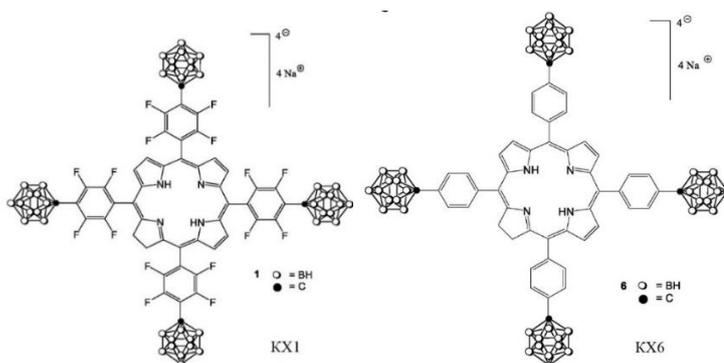


Рисунок 1 – Структурная формула красителей KX1 и KX6

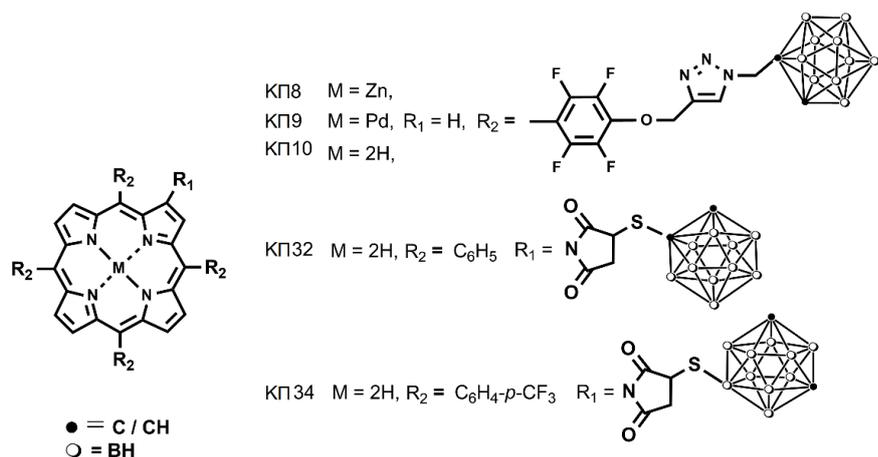


Рисунок 2 – Структурные формулы порфиринов

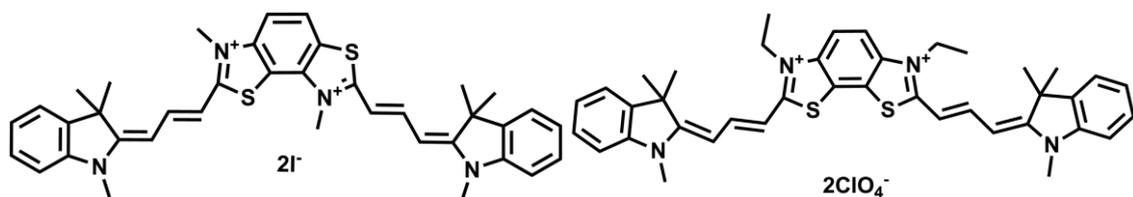


Рисунок 3 – Структурные формулы красителей БКЦ1(слева) и БКЦ2 (справа)

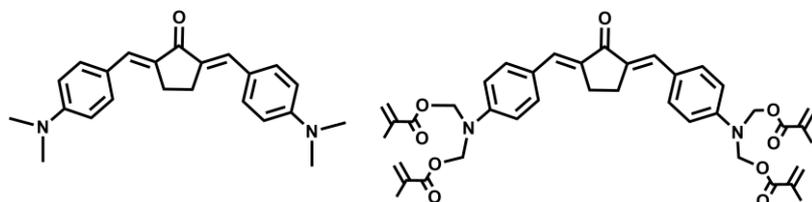


Рисунок 4 – Структурная формула красителей КЦ1(слева) и КЦ2(справа)

Глава 3. Результаты и обсуждение

Третья глава посвящена основным результатам исследования фотохимических свойств тетрапиррольных и цианиновых красителей и их комплексов с биомакромолекулами.

В разделе 3.1 описаны спектрально-кинетические характеристики новых карборанилтетрапирролов (КХ1, КХ6, КП8, КП9, КП10, КП32, КП24).

Спектры поглощения соединений КХ1 и КХ6 (Рисунок 5) характерны для тетрапиррольных красителей. В коротковолновой области присутствует высокоинтенсивная полоса поглощения *Soret* ($\epsilon \sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), в более длинноволновой области спектра находятся менее интенсивные *Q*-полосы. Соединение КХ1 обладает интенсивным поглощением в красной области электромагнитного спектра ($\lambda_{\text{max}} = 653 \text{ нм}$, $\epsilon = 7,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

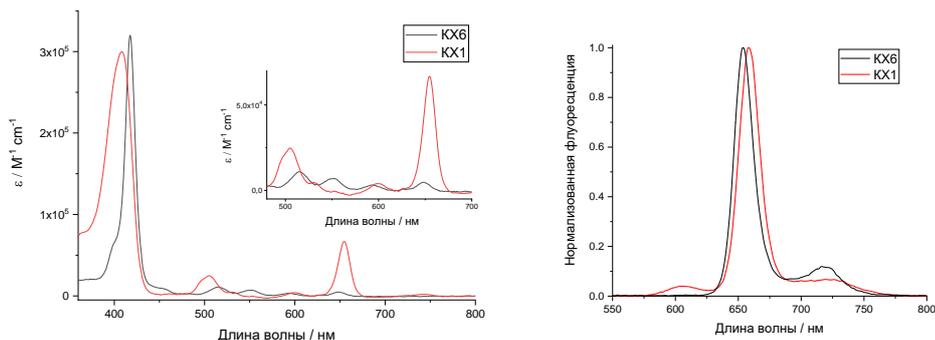


Рисунок 5 – Спектры поглощения и флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 515 \text{ нм}$) карборанилхлоринов (КХ1 и КХ6) в этаноле

Спектры флуоресценции красителей сходны и имеют максимумы при 658 нм для КХ1 и 654 нм для КХ6. Кинетика гибели флуоресценции данных соединений в ацетонитриле моноэкспоненциальна, со временами жизни 6,1 нс для КХ1 и 8,9 нс для КХ6, а квантовые выходы флуоресценции равны 0,17 для КХ1 и 0,12 для КХ6 (растворитель - ацетонитрил). В ряду красителей КП8, КП9 и КП10 введение атомов Zn и Pd в координационный центр тетрапиррола приводит к усилению спин-орбитального взаимодействия, которое приводит к ускорению интеркомбинационной конверсии (ИКК) и уменьшению флуоресценции. При введении Pd в тетрапиррольный краситель наблюдается уменьшение квантового выхода флуоресценции в 10 раз (Таблица 1).

Таблица 1 – Спектрально-кинетические характеристики карборанилпорфиринов в ДМСО и ацетонитриле*

Соединение	$\lambda_{\text{max}} / \text{нм}$			ϕ_{fl}	$\tau_{\text{fl}} / \text{нс}$
	Полоса Core	Q-полосы	$\lambda_{\text{фл}}$		
КП32	421	516,550,593,648	653,718	0,03	8,4
КП34	420	516,548,592,646	650,715	0,04	9,1
КП8* (Zn)	419	550,585	662, 710	0,019	1,7
КП9* (Pd)	407	518,550,595	-	0,003	-
КП10*	412	506,584,657	648	0,03	8,4

Установлено, что введение карборановых заместителей в молекулу тетрапиррола позволяет сохранить флуоресцентные свойства молекулы.

В разделе 3.2 охарактеризованы спектрально-кинетические характеристики возбужденных состояний тетрапиррольных красителей КХ1, КХ6, КП32, КП34, КП8, КП9 и КП10 и их комплексов с молекулами ЧСА и ЛПНП.

Для оценки возможности доставки молекул ФС в клетки были исследованы процессы комплексообразования с молекулами-транспортёрами (альбумин и ЛПНП).

Комплексообразование красителей с ЧСА / ЛПНП приводит к увеличению жесткости молекулярной структуры красителя и сопутствующему ему росту интенсивности флуоресценции (Рисунок б).

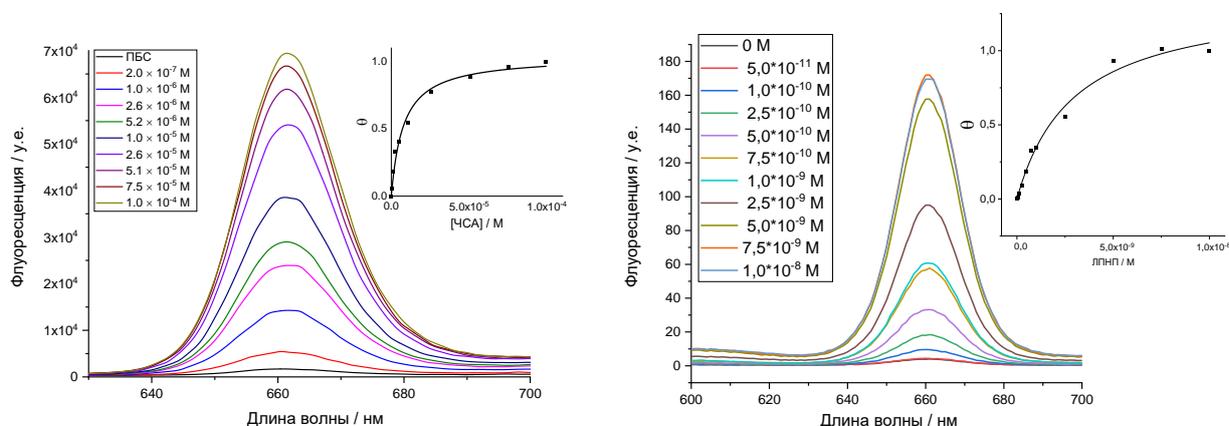


Рисунок б – Слева - спектры флуоресценции КХ1 ($\lambda_{\text{возб}} = 430$ нм) при различной концентрации ЧСА ($0 - 1 \times 10^{-4}$ М), фосфатно-солевой буфер, рН = 7,4. Вставка: зависимость степени связывания красителя от концентрации белка ($\lambda_{\text{рег}} = 660$ нм). Справа - спектры флуоресценции КХ1 ($\lambda_{\text{возб}} = 410$ нм) при различных концентрациях ЛПНП ($0 - 1 \times 10^{-8}$ М), фосфатно-солевой буфер, рН = 7,4. Вставка: зависимость степени связывания красителя от концентрации ЛПНП ($\lambda_{\text{рег}} = 660$ нм)

Механизм взаимодействия КХ1 с ЧСА значительно отличается от взаимодействия с ЛПНП. Комплексообразование хлоринов с ЧСА происходит с по сайту связывания FA1, который находится в субдомене IV. Взаимодействие КХ1 с ЛПНП осуществляется при переходе молекулы хлорина из водной фазы в везикулы, образованные ЛПНП. Поскольку везикулы состоят в среднем из 800 единиц фосфолипидов, необходимо внести корректировку в значение константы связывания с ЛПНП ($K = K_b/800$). Полученные константы связывания с ЧСА и ЛПНП приведены в Таблице 2. Высокие значения констант связывания указывают на эффективность комплексообразования данных лигандов с ЧСА и ЛПНП.

Таблица 2 – Значения констант комплексообразования карборанилтетрапирролов с ЧСА и ЛПНП

	ЧСА	ЛПНП
	$K_b \times 10^{-5} / \text{M}^{-1}$	
КХ1	1,3	4,2
КХ6	3,2	5,5
КП32	3,0	-
КП34	5,4	-
КП8	3,3	5,0
КП9	-	5,9
КП10	-	9,2

Все соединения продемонстрировали высокие константы связывания с биомолекулами ($K_b \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$).

В разделе 3.3 рассматриваются триплетные состояния тетрапиррольных красителей КП32, КП8, КП9, КП10, КХ1.

Триплетные состояния ФС образуются в результате ИКК из возбужденного синглетного состояния (Уравнение 1). Возбужденное триплетное состояние в отсутствие кислорода переходит в основное состояние (Уравнение 2).



где k_T — константа скорости гибели триплетного состояния.

Для определения спектрально-кинетических характеристик триплетных состояний ФС использовался метод импульсного фотолиза. Триплет-триплетные спектры тетрапиррольных красителей (Рисунок 7), демонстрировали поглощение триплетных состояний в области 440 - 500 нм, наряду с интенсивным выцветанием синглетного состояния (около 400 нм). Кинетика гибели триплетного состояния моноэкспоненциальна, константы скорости приведены в Таблице 3.

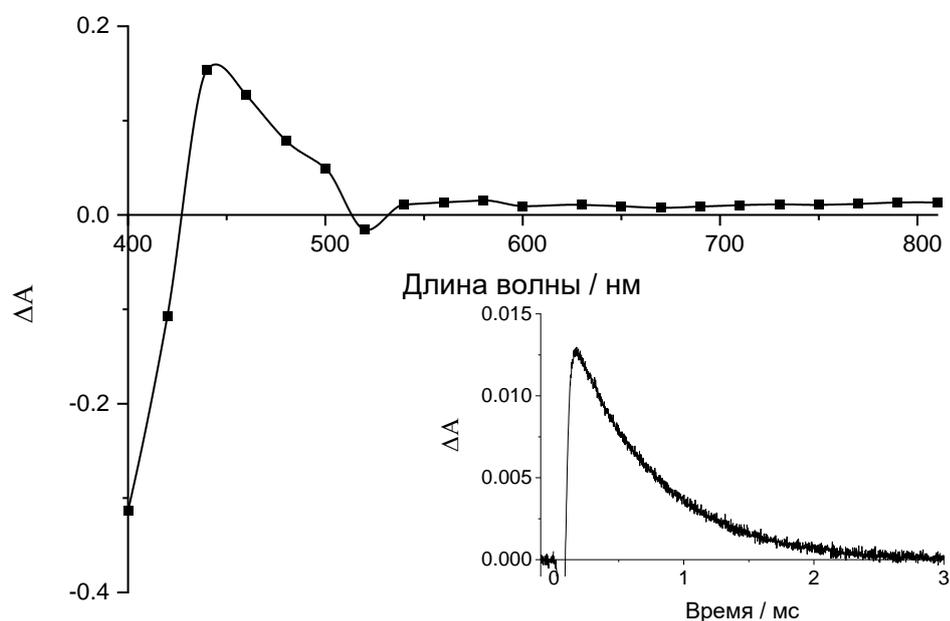


Рисунок 7 — Дифференциальные триплет-триплетные спектры поглощения соединения КП9 (10^{-7} M) в пропанол-1 (200 мкс после вспышки). Вставка: кинетика гибели триплетного состояния при 710 нм

Таблица 3 – Константы скорости гибели триплетных состояний карборанилпорфиринов и хлоринов в пропанол-1

	КП8	КП9	КП10	КП32	КХ1
k_T / c^{-1}	$1,2 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	$0,9 \times 10^3$

Исследование образования синглетного кислорода в процессах фотосенсибилизации представляет интерес, поскольку синглетный кислород является одним из АФК, которые могут приводить к гибели клеток. В результате переноса энергии с триплетного состояния фотосенсибилизатора на молекулярный кислород, происходит образованием синглетного кислорода (Уравнение 3). Регистрация 1O_2 может осуществляться по люминесценции в ближней ИК области ($\lambda_{max} \sim 1275$ нм), (Уравнение 4).



где, k_q — константа скорости тушения кислородом триплетного состояния.



Квантовые выходы синглетного кислорода для ФС рассчитывались с использованием в качестве стандарта тетрафенилпорфирина ($\Phi_\Delta = 0,60$ в ацетонитриле). Все исследуемые тетрапирролы обладают выраженной способностью генерировать синглетный кислород ($\Phi_\Delta > 0,5$), (Таблица 4), сравнимую с коммерческими препаратами для ФДТ.

Таблица 4 – Квантовые выходы синглетного кислорода Φ_Δ (1O_2) для карборанилтетрапирролов в насыщенных воздухом растворах ацетонитрила и ДМСО*

Соединение	КП8	КП9	КП10	КХ1	КХ6	П5*	КП32*
Φ_Δ	0,75	0,80	0,66	0,59	0,54	0,77	0,81

Методом импульсного фотолиза были установлены спектрально-кинетические характеристики триплетного состояния КХ1 в комплексе с ЧСА. При увеличении концентрации ЧСА в растворе с КХ1 наблюдалось возрастание триплетного поглощения красителя (Рисунок 8), что объясняется увеличением квантового выхода ИКК вследствие образования жесткой структуры красителя в комплексе с альбумином и уменьшением вклада внутренней конверсии. Кинетика гибели триплетного состояния КХ1 в комплексе с ЧСА моноэкспоненциальна с $k_T = 1,1 \times 10^3 c^{-1}$.

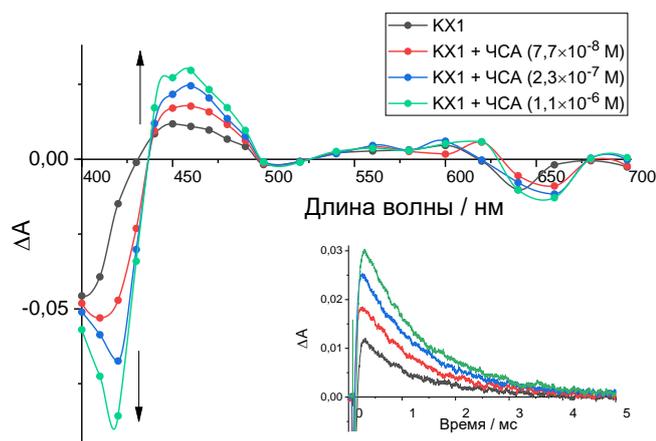


Рисунок 8 – Дифференциальные триплет-триплетные спектры КХ1 при различных концентрациях ЧСА ($0 - 1,1 \times 10^{-6}$ М) в фосфатно-солевом буфере, рН 7,4, (200 мкс после вспышки). На врезке показана кинетика гибели триплетного состояния КХ1 при 440 нм и различной концентрации ЧСА

Для оценки степени экранированности триплетного состояния молекулой ЧСА были проведены эксперименты по определению константы тушения триплетного состояния ФС кислородом (Таблица 6).

Таблица 6 – Значения констант тушения триплетного состояния соединения КХ1 молекулярным кислородом в различных условиях

	Фосфатно-солевой буфер	ЧСА	БСА
$k_q / \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$	$1,8 \times 10^9$	$4,5 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$

При тушении триплетных состояний КХ1 кислородом в растворе, константа тушения обычно равна диффузионной константе скорости ($k_{\text{diff}} = 8RT/3000\eta$) с учетом спин-статистического фактора 1/9. Для водных растворов при комнатной температуре 1/9 k_{diff} равна $\sim 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$. Полученная константа скорости тушения триплетного состояния КХ1 молекулярным кислородом в комплексе с альбумином в 4 раза меньше по сравнению с водным раствором КХ1. Это объясняется возникающими стерическими затруднениями при взаимодействии молекулярного кислорода и встроенного в структуру альбумина триплетного состояния. Близкие значения констант тушения кислородом триплетного состояния КХ1 в комплексе с БСА и ЧСА объясняется высоким сходством данных белков.

В экспериментах с раковыми клетками глиомы С6 было показано образование АФК при освещении клеток, нагруженных КХ1. Установленная темновая цитотоксичность КХ1 и КХ6 на раковых клетках равна $IC_{50} > 44 \text{ мкМ}$ после 72 часов инкубирования.

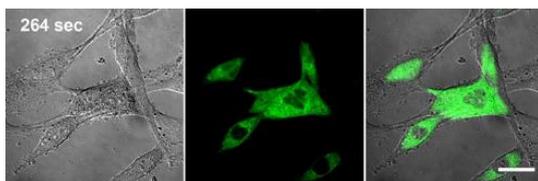


Рисунок 9 – Генерация АФК в раковых клетках С6 при фотоактивации соединения КХ1. Масштаб – 20 мкм

В сочетании со световой обработкой, КХ1 ($C = 5 \text{ мкМ}$) вызывает 100% гибель клеток. При этом уже через 1 минуту после освещения в клетках повышается уровень АФК. Через несколько минут вся цитоплазма клеток ярко окрашивается DHR 123 (индикатор АФК) (Рисунок 9). Через 10 минут после фотоактивации клетки прокрашиваются иодистым пропидием или SYTOX™, что указывает на потерю барьерной функции мембран.

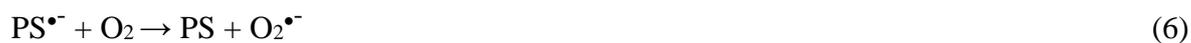
В экспериментах по фотоцитотоксичности на клетках НСТ116 установлено, что наибольшей цитотоксичностью обладают красители КП32 и КП9 ($IC_{50} \sim 1 \text{ мкМ}$).

В разделе 3.4 охарактеризован фотоиндуцированный перенос электрона от донора электрона к бискарбонианиновому красителю и комплексообразование с ЧСА.

Одним из механизмов действия ФС является перенос электрона на триплетное состояние ФС с молекулы-донора (Уравнение 5):



В результате образуется радикал-анион ФС, который в дальнейшем может реагировать с молекулярным кислородом с образованием супероксидного радикала (Уравнение 6):



Для того чтобы установить возможность образования анион радикалов красителей БКЦ1 и БКЦ2 в результате переноса электрона и потенциального действия БКЦ как ФС I-го типа, были проведены эксперименты по импульсному фотолизу в модельной системе с донором электрона (аскорбиновой кислотой – АК).

При импульсном фотовозбуждении раствора БКЦ1 формируется триплетное состояние красителя, характеризующееся дифференциальным спектром поглощения (Рисунок 9, а, 1). В отсутствие кислорода кинетика гибели триплетного состояния БКЦ1 моноэкспоненциальна со временем жизни 350 мкс и константой скорости тушения кислородом $k_{qO_2} = 2,0 \times 10^9 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$. При добавлении аскорбиновой кислоты наблюдается тушение триплетного состояния БКЦ1 за счет

переноса электрона (Уравнение 7) ($k_{qAA} = 2,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) и изменение дифференциального спектра поглощения (Рисунок 10, а, 2).

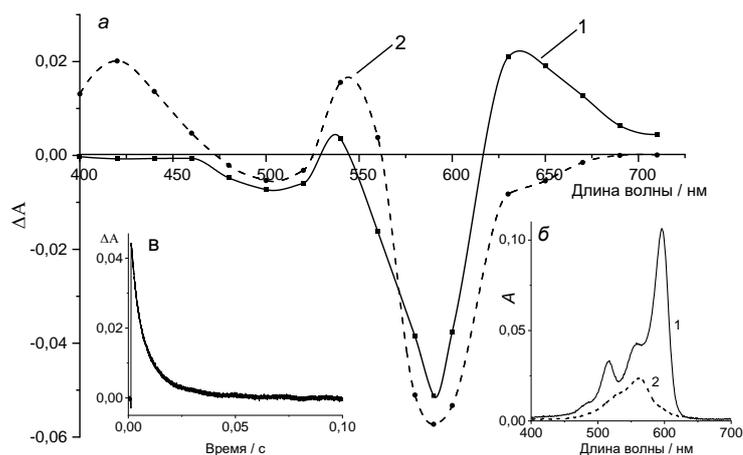
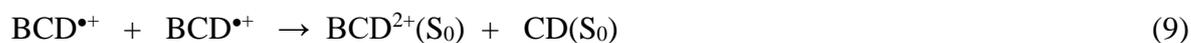
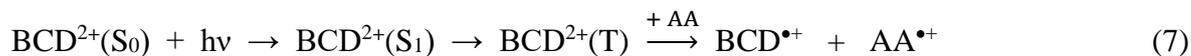


Рисунок 10 – (а) Дифференциальные спектры поглощения раствора БКЦ1 ($3 \times 10^{-7} \text{ M}$) в пропаноле-1 через 200 мкс после фотовозбуждения в отсутствие (1) и в присутствии $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ аскорбиновой кислоты (2). На вставке (в) показана кинетика распада катион-радикала БКЦ^{•+} при 420 нм в растворе БКЦ1 ($6 \times 10^{-7} \text{ M}$) в присутствии $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ аскорбиновой кислоты. (б) Спектры поглощения раствора БКЦ1 в пропаноле-1 ($4 \times 10^{-7} \text{ M}$) после фотолиза (1) в отсутствие и (2) в присутствии аскорбиновой кислоты

Фотовозбуждение БКЦ1 в присутствии АК изменяет синглет-синглетный спектр поглощения БКЦ1. Возникающий спектр поглощения при высоких концентрациях АК совпадает со спектром монохромофорного цианинового красителя (ЦК), что указывает на разрушение бисхромофорной системы (Рисунок 10, б). Были рассчитаны коэффициенты молярной экстинкции для триплетного состояния БКЦ²⁺ ($\epsilon_{630} = 9,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и катион-радикала БКЦ^{•+} ($\epsilon_{420} = 7,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Обратная рекомбинация (Уравнение 8) не является основным путем гибели радикала, т.к. подразумевает полностью обратимое превращение, что не согласуется с изменениями в спектрах поглощения БКЦ1. Кинетика гибели БКЦ^{•+} соответствует реакции второго порядка (Рисунок 10, в). Предположительно рекомбинация радикалов (Уравнение 9) протекает с разрушением π -сопряженной цепи одной молекулы красителя с образованием монохромофорного цианинового красителя (ЦК) (что согласуется со спектром

поглощения) и с восстановлением одной исходной молекулы красителя (БКЦ1). Полученная константа рекомбинации радикалов красителя $2k = 1,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ для БКЦ1 и $1,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ БКЦ2. Взаимодействие анион-радикала БКЦ с молекулярным кислородом может приводить к образованию цитотоксического супероксидного радикала. Способность молекулы БКЦ1 действовать как ФС по механизму переноса электрона может иметь важное значение для последующего исследования механизмов ФДТ.

Исследование связывания БКЦ1 с альбумином сопровождается усилением флуоресценции и увеличением времени жизни синглетно-возбужденного состояния красителя (Рисунок 11).

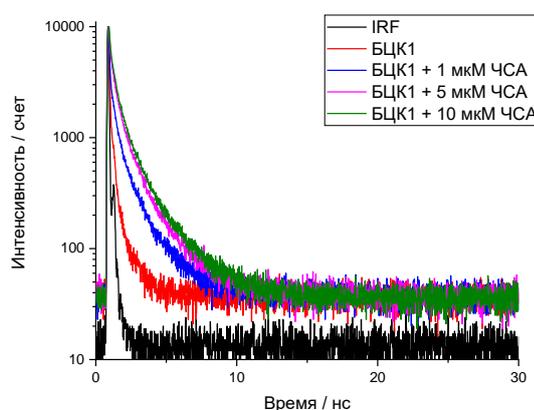


Рисунок 11 – Кинетика гибели флуоресценции БКЦ1 ($4 \times 10^{-7} \text{ M}$) при различных концентрациях ЧСА ($0 - 1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$). ($\lambda_{\text{возб}} = 590 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{рег}} = 660 \text{ nm}$)

В фосфатном буфере, наблюдается моноэкспоненциальная гибель флуоресценции БКЦ1 со временем жизни около 0,2 нс. При добавлении ЧСА, в кинетике появляются новые долгоживущие компоненты (0,5 нс и 1,5 нс). При последующем увеличении концентрации альбумина, короткоживущая компонента, соответствующая времени жизни синглетно-возбужденного состояния свободной молекулы БКЦ1, исчезает, что указывает на полное связывание молекул красителя с ЧСА. Появление двух новых долгоживущих компонент в кинетике гибели флуоресценции по всей видимости соответствуют образованию двух типов комплексов красителя с альбумином. БКЦ1 и БКЦ2 связываются с ЧСА между субдоменами IIА и IIIА, в широком умеренно полярном кармане, при этом один концевой индолин расположен в глубине кармана, в то время как второй ориентирован в сторону внешней поверхности белка. Константа связывания БКЦ1 с ЧСА составила $K_b = 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Методами импульсного фотолиза было показано образование триплетного состояния красителя БКЦ1 в комплексе с ЧСА. Константа скорости гибели триплетного состояния красителя в комплексе с ЧСА составила $k_T = 1500 \text{ s}^{-1}$ для БКЦ1 и $k_T = 1650 \text{ s}^{-1}$ для БКЦ2.

Для оценки возможности доставки молекул БКЦ в клетки-мишени был охарактеризован процесс комплексообразования с ЧСА. Показано образование нековалентного комплекса красителя с альбумином, сопровождающееся увеличением флуоресценции молекулы БКЦ. Было установлено образование анион радикала красителя БКЦ в результате переноса электрона от молекулы донора. Установленный процесс фотопереноса электрона свидетельствует о возможности образования супероксидного радикала в результате реакции, анион радикала БКЦ с молекулярным кислородом.

В разделе 3.5 описаны фотохимические свойства кетоцианиновых красителей на основе α, α' -бис (замещенных бензилиден) циклопентанонов.

Введение карбонильной группы в молекулу цианинового красителя приводит к появлению триплетного состояния (n, π^*) типа, локализованного на атоме карбонильной группы. Данные триплетные состояния отличаются высокой реакционной способностью. Выраженная ИКК и способность генерировать радикальные интермедиаты позволяет рассматривать данные соединения не только как потенциальные ФС, но как ФИ для использования в процессах фотополимеризации. Установлено что КЦ2 образует комплекс с ЧСА с константой комплексообразования $K_b = 6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Наличие электродонорной (диэтиланилин) и электроакцепторной карбонильной группы приводит к внутримолекулярному переносу заряда в молекулах КЦ1 и КЦ2. Результатом этого является значительный сольватохромизм (Рисунок 12).

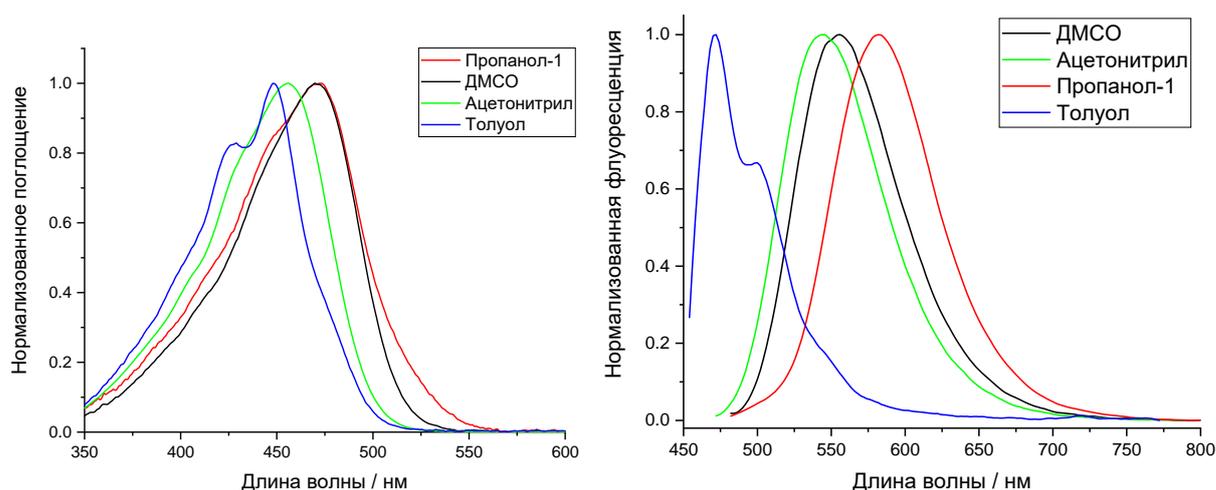


Рисунок 12 – Нормализованные спектры поглощения (слева) и флуоресценции (справа) красителя КЦ2 в различных растворителях

В неполярных апротонных растворителях, таких как толуол, квантовый выход флуоресценции кетоцианинового красителя КЦ2 снижается при введении метакрилатных групп

(Таблица 7) по сравнению с незамещенным КЦ1. Причиной этого является частичное нарушение планарности молекулы и ускорение процессов колебательной релаксации.

Таблица 7 – Флуоресцентные характеристики красителей КЦ1 и КЦ2 в различных растворителях

Растворитель	Соединение	$\Phi_{\text{фл}}$	$\tau_{\text{фл}} / \text{нс}$
Ацетонитрил	КЦ1	0,10	0,67
	КЦ2	0,11	0,71
Толуол	КЦ1	0,08	0,30
	КЦ2	0,05	0,24
Пропанол-1	КЦ1	0,15	0,46
	КЦ2	0,35	1,16
ДМСО	КЦ1	0,17	0,78
	КЦ2	0,20	0,84

Стабилизацию синглетно-возбужденного состояния красителя водородными связями с молекулами растворителя можно наблюдать при изучении времен жизни флуоресценции в пропанол-1. Время жизни флуоресценции для КЦ2 увеличивается в 2,5 раза из-за образования водородных связей между растворителем и метакрилатными группами молекулы КЦ2.

В разделе 3.6 приведены спектрально-кинетические характеристики триплетного состояния кетоцианинового красителя КЦ2.

В триплет-триплетных спектрах поглощения соединения К2 в ацетонитриле наблюдается поглощение триплетного состояния в области (520-740 нм), а также выцветание основного состояния около 450 нм (Рисунок 13).

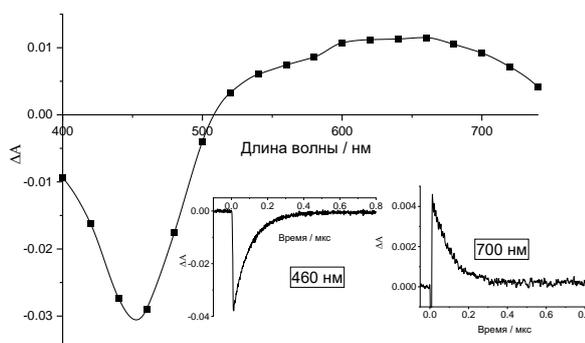


Рисунок 13 – Дифференциальный триплет-триплетный спектр поглощения КЦ2 ($8,0 \times 10^{-6}$ М) в ацетонитриле (без удаления кислорода) через 35 нс после вспышки. Возбуждение при 455 нм.

Вставки показывают выцветание синглетного состояния при 460 нм и гибель триплетного состояния КЦ2 при 700 нм ($k = 1,1 \times 10^7 \text{ c}^{-1}$)

В дальнейшем проводили определение квантового выхода синглетного кислорода для соединений КЦ1 и КЦ2 в различных растворителях (Таблица 8).

Таблица 8 – Значения квантового выхода синглетного кислорода (Φ_{Δ}) для КЦ1 и КЦ2 в различных растворителях

Соединение	Ацетонитрил	Толуол	Пропанол-1
КЦ1	0,14	0,16	0,05
КЦ2	0,17	0,11	0,08

Молекулярное окружение красителя влияет на эффективность генерации синглетного кислорода. В пропанол-1 это увеличение квантового выхода синглетного кислорода для КЦ2 достигает почти 40%. Это связано с дополнительной стабилизацией триплетного состояния КЦ2 водородными связями молекул спирта. Противоположная ситуация наблюдается в случае неполярных растворителей, таких как толуол. В отсутствие эффекта стабилизации растворителя роль колебательной релаксации для КЦ2 возрастает (из-за наличия метакрилатных заместителей), а роль интеркомбинационной конверсии и флуоресценции уменьшается.

Предложенный механизм образования исходных радикальных интермедиатов из молекулы КЦ2 в триплетном состоянии заключается в быстром внутри/межмолекулярном переносе электрона и следующего за ним переноса протона (Рисунок 14).

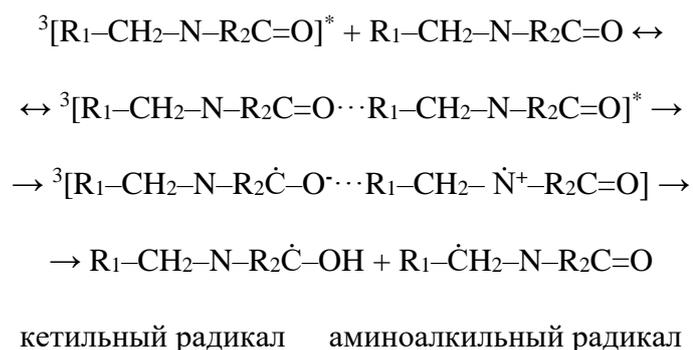


Рисунок 14 – Предложенный механизм образования радикалов при фотовозбуждении КЦ2

В результате образуются кетильный и аминоалкильный радикалы, которые участвуют в процессе полимеризации. Методами импульсного фотолиза были получены спектральные характеристики радикальных интермедиатов для КЦ1 и КЦ2 в пропанол-1 (Рисунок 15). На дифференциальном спектре поглощения наблюдается более интенсивное поглощение данных

интермедиатов в случае КЦ2 (красный) по сравнению с КЦ1 (черный), что указывает на более интенсивную генерацию радикалов в случае КЦ2.

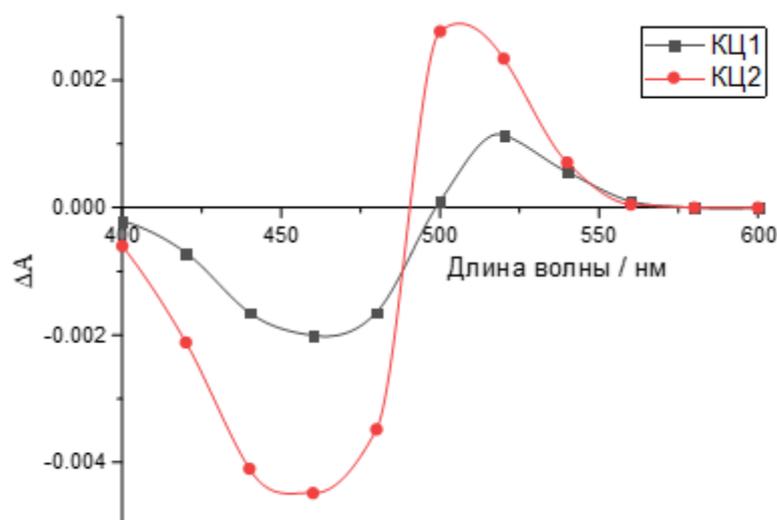


Рисунок 15 – Дифференциальный временной спектр поглощения соединения КЦ1 (1×10^{-6} М) и КЦ2 (1×10^{-6} М) в пропанол-1, 50 мс после вспышки

Для исследованных кетоцианинов было показано, что введение метакрилатных заместителей приводит к стабилизации возбужденных состояний за счет образования водородных связей с молекулами протонных растворителей, с соответствующим увеличением квантовых выходов флуоресценции (+55%) и синглетного кислорода (+40%). В качестве мономера в процессе полимеризации использовался триакрилат пентаэритрита, который является полярной и протонной молекулой, также способной стабилизировать возбужденные состояния молекулы фотоинициатора. Показано увеличение генерации радикальных интермедиатов для нового метакрилатного производного, что указывает на улучшенные свойства данного фотоинициатора. Методом DLW-фотографии с использованием данного фотоинициатора были созданы различные микроструктуры с минимальным размером элемента, достигающим 45 нм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках представленной диссертационной работы были охарактеризованы фотохимические свойства ряда новых карборанилтетрапиррольных, бискарбоницианиновых и кетоцианиновых красителей и их комплексов с биомакромолекулами (альбумин, ЛПНП). Методами импульсного фотолиза было показано ключевое значение триплетных состояний красителей в процессах фотосенсибилизации. Введение карборановых заместителей в тетрапиррольные красители позволяет сохранить как флуоресцентные свойства красителей, так

и выраженную фотосенсибилизирующую способность ($\Phi_{\Delta} > 0,5$), сравнимую с коммерческими препаратами для ФДТ. Создание конъюгатов карборанов и тетрапирролов позволяет получить бифункциональные терапевтические агенты, которые могут использоваться как в ФДТ, так и в бор-нейтронозахватной терапии. Сохранение флуоресцентных свойств карборан-замещенных красителей также позволяет осуществлять флуоресцентную визуализацию бора в биологических тканях. Для оценки возможности доставки фотосенсибилизаторов в клетки было проведено исследование процесса комплексообразования с такими молекулами-транспортерами как альбумин и ЛПНП. Установлено что исследуемые карборанилтетрапирролы и бискарбоцианины образуют нековалентные комплексы с данными биомакромолекулами, что сопровождается усилением флуоресценции красителей. В комплексах с белками и ЛПНП происходит стабилизация синглетно-возбужденных состояний красителей за счет увеличения жесткости структуры красителя при встраивании его в биомакромолекулу. Для бискарбоцианиновых красителей показана возможность фотосенсибилизирующего действия по механизму I-го типа (перенос электрона), с образованием анион радикала красителя. Полученный анион-радикал красителя вступая в реакцию с молекулярным кислородом может приводить к образованию цитотоксического супероксидного радикала. Разработка фотосенсибилизаторов I-го типа является перспективным направлением для терапии опухолей с выраженной гипоксией. Для кетоцианиновых красителей установлено, что новое метакрилатное производное КЦ2 имеет более высокий квантовый выход синглетного кислорода (+40%) по сравнению с незамещенной молекулой (КЦ1) в условиях аналогичных условиям проведения фотополимеризации. Показана более высокая эффективность генерации радикальных интермедиатов для соединения КЦ2. Данные фотохимических исследований позволяют говорить о том, что новое метакрилатное производное КЦ2 является более эффективным фотоинициатором для применения в аддитивных технологиях.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что введение карборанов в тетрапиррольные красители позволяет сохранить высокие значения квантового выхода синглетного кислорода ($\Phi_{\Delta} > 0,5$), которая сравнима с коммерческими препаратами для ФДТ. При этом наличие карборановых заместителей позволяет рассматривать данные фотоактивные молекулы в качестве агентов для бор-нейтронозахватной терапии.
2. Исследованные карборанилтетрапирролы и бискарбоцианиновые красители образуют комплексы с молекулами ЧСА и ЛПНП с константой связывания $K_b \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$. В процессе

комплексообразования наблюдается усиление флуоресценции, как результат увеличения жесткости молекулярной структуры красителя.

3. Получены спектрально-кинетические характеристики продуктов переноса электрона на триплетное состояние красителей БКЦ1 и БКЦ2. Полученный в результате переноса электрона анион-радикал красителя в реакциях с молекулярным кислородом может образовывать супероксидный радикал. Установлено, что красители БКЦ1 и БКЦ2 могут выступать как фотосенсибилизаторы I-го типа.

4. Установлено, что введение в молекулу фотосенсибилизатора метакрилатного заместителя (КЦ2) существенно (+40%) увеличивает эффективность генерации синглетного кислорода, в условиях аналогичных условиям проведения полимеризации. Новое производное является более эффективным фотоинициатором в процессах полимеризации, применяемых в аддитивных технологиях.

5. Показано цитотоксическое влияние тетрапиррольных красителей на опухолевые клетки НСТ116 *in vitro*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК:

- [1] A. E. Egorov, A. A. Kostyukov, D. A. Shcherbakov, D. A. Kolymagin, D. A. Chubich, R. P. Matital, M. V. Arsenyev, I. D. Burtsev, M. G. Mestergazi, E. R. Zhiganshina, S. A. Chesnokov, A. G. Vitukhnovsky, and V. A. Kuzmin, "Benzylidene cyclopentanone derivative photoinitiator for two-photon photopolymerization-photochemistry and 3d structures fabrication for x-ray application," *Polymers*, vol. 15, no. 1, p. 71, 2023.
- [2] А. Е. Егоров, А. А. Костюков, В. М. Алпатова, В. А. Ольшевская, В. А. Кузьмин, "Взаимодействие триплетного состояния модифицированного порфиринового красителя с нитроксильным радикалом", *Химия высоких энергий*, т. 55, №1, с. 98-100, 2021.
- [3] A. E. Egorov, A. A. Kostyukov, I. E. Borissevitch, and V. A. Kuzmin, "Photoinduced electron transfer from electron donor to bis-carbocyanine dye in excited triplet state", *Mendeleev Communications*, vol. 31, no. 1, pp. 68–69, 2021.
- [4] V. A. Olshevskaya, A. V. Zaitsev, A. S. Petrova, A. Y. Arkhipova, M. M. Moisenovich, A. A. Kostyukov, A. E. Egorov, O. A. Koroleva, G. V. Golovina, Y. L. Volodina, E. V. Kalinina, V. A. Kuzmin, Y. Sakurai, H. Tanaka, N. Miyoshi, and A. A. Shtil, "The synthetic fluorinated tetracarboranylchlorin as a versatile antitumor photoradiosensitizer", *Dyes and Pigments*, vol. 186, p. 108993, 2021
- [5] А. Е. Егоров, А. А. Костюков, Т. Д. Некипелова, А. Ш. Радченко, А. В. Шибаета, М. А. Климович, Ю. Е. Борисевич, В. А. Кузьмин, "Фотовосстановление триплетного состояния бискарбоцианинового красителя", *Химия высоких энергий*, т. 54, №2, с. 155-157, 2020.
- [6] V. A. Ol'shevskaya, A. V. Zaitsev, A. V. Makarenkov, E. G. Kononova, A. A. Markova, A. A. Kostyukov, A. E. Egorov, M. A. Klimovich, O. A. Koroleva, and V. A. Kuzmin, "Synthesis of boronated meso-arylporphyrins via copper-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition reaction and their binding ability towards albumin and low-density lipoproteins," *Journal of Organometallic Chemistry*, p. 121248, 2020.
- [7] V. A. Ol'shevskaya, V. M. Alpatova, A. S. Radchenko, A. A. Ramonova, A. S. Petrova, V. V. Tatarskiy, A. V. Zaitsev, E. G. Kononova, N. S. Ikonnikov, A. A. Kostyukov, A. E. Egorov, M. M. Moisenovich, V. A. Kuzmin, N. A. Bragina, A. A. Shtil "β-Maleimide substituted meso-arylporphyrins: Synthesis, transformations, physico-chemical and antitumor properties" *Dyes and Pigments*, vol. 171, p. 107760, 2019.

Тезисы докладов на конференциях:

1. Егоров А.Е. / Триплетные состояния бискарбодиазонинов и порфиринов и их роль в механизме фотодинамической терапии / Егоров А.Е., Костюков А.А., Радченко А.Ш., Кривелева А.С., Подругина Т.А., Кузьмин В.А. // Симпозиум Современная химическая физика, Туапсе, Россия, 16-25 сентября 2019.
2. Кузьмин В.А. / Новое производное тетраакис-пентафторфенил хлорина как универсальный фоторадиосенсибилизатор / Кузьмин В.А., Ольшевская В.А., Зайцев А.В., Петрова С.А., Архипова А.Ю., Мойсенович М.М., Костюков А.А., Егоров А.Е., Королева О.А., Головина Г.Г., Володина Ю.Л., Калинина Е.В., Сакурай Ю., Танака Х., Миеси Н., Штиль А.А. // Симпозиум Современная химическая физика, Туапсе, Россия, 24 сентября – 4 октября 2021.
3. Егоров А.Е. / Фотохимические процессы нового фотоинициатора в процессах полимеризации / Егоров А.Е., Костюков А.А., Бурцев И.Д., Щербаков Д.А., Колымагин Д.А., Чубич Д.А., Гладких Е.В., Усейнов А.С., Чесноков С.А., Витухновский А.Г., Кузьмин В.А. // Конференция химия, физика, биология: пути интеграции, Москва, 20–22 апреля 2022 года.