



«Утверждаю»
Директор ИХФ РАН
академик А.А. Берлин

« 24 » марта 2016 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН на диссертацию **Рыбкина Александра Юрьевича** на тему **«Фотофизические и фотодинамические свойства водорастворимых гибридных структур фуллерен-краситель»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - биофизика.

Представленная диссертационная работа является междисциплинарным исследованием, выполненным на стыке физики, химии и биологии, посвященным исследованию фотофизических свойств и фотодинамических процессов в структуре комплексов катионных производных фуллеренов с ксантоновыми и фталоцианиновыми красителями, а также в ковалентных конъюгатах фуллерен-краситель в водных растворах и в модельных биологических структурах с целью развития научных основ создания новых высокоэффективных фотосенсибилизаторов для медицины.

Актуальность темы исследования

Фотодинамическая терапия представляет собой самостоятельное и активно развивающееся направление в онкологии и в других областях медицины. Фотодинамический метод лечения имеет важные преимущества по сравнению с другими традиционными методами лечения – низкую темновую токсичность препаратов и селективное воздействие на опухоль. В качестве фотодинамических препаратов в медицинской практике наиболее широко применяются препараты на основе производных порфирина и хлорина, имеющие достаточно высокий квантовый выход в триплетное состояние. К данным препаратам предъявляется широкий спектр разносторонних, зачастую противоречивых требований: возбуждение в красной области спектра, растворимость в воде, селективное накопление в опухоли и быстрый вывод из организма. В связи с этим реальный выбор новых красителей в качестве эффективных фотосенсибилизаторов крайне ограничен.

В данной диссертационной работе экспериментально обосновывается и тестируется на биологических системах различного уровня организации принципиально новый подход к созданию фотодинамических препаратов нового поколения на основе объединения в одной молекулярной структуре красителя и фуллерена, что обеспечивает эффективную дезактивацию как триплетных, так и синглетных возбужденных состояний красителей с переносом возбуждения на сфероид фуллерена и последующей генерацией на нем активных форм кислорода. Обнаруженный эффект интенсивного тушения именно синглетных возбужденных состояний красителя ядром фуллерена позволяет значительно повысить фотохимическую и фотодинамическую активность диад фуллерен-краситель по сравнению со свободными красителем и фуллереном, даже в случае, если свободный краситель не проявляет фотодинамической активности. В результате предлагаемый подход открывает принципиальную возможность значительно расширить возможности поиска красителей, пригодных для создания новых высокоэффективных фотосенсибилизаторов.

Таким образом, можно констатировать, что тема исследования А.Ю. Рыбкина **обоснована, актуальна и соответствует общему направлению исследований** в области биофизики фотобиологических процессов.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа содержит в своей структуре литературный обзор, главу, описывающую применяемые в работе материалы и методы, три экспериментальные главы, заключение, выводы и список литературы. Диссертация изложена на 167 страницах, содержит 38 рисунков и 10 таблиц. Список литературы включает 270 источников.

Следует отметить значительный по объему и подробный по научному содержанию литературный обзор (глава 1), в котором отражены современные представления о механизмах действия фотосенсибилизаторов, о фотофизических и фотобиологических свойствах возбужденного фуллерена C_{60} и его производных, а также о фотодинамическом действии различных молекулярных структур фуллерен-краситель.

Опубликованные литературные данные свидетельствуют о большом интересе исследователей к созданию гибридных структур фуллерен-краситель. Однако подавляющее большинство представленных в литературе структур нерастворимо в воде и предназначено для применения в фотовольтаике. Созданию диад фуллерен-краситель как потенциальных фотосенсибилизаторов посвящено весьма ограниченное число работ, и только единицы из них описывают создание структур, обладающих приемлемой растворимостью в воде.

Большая часть представленных в литературе диад фуллерен-краситель требует применения специальных методов солюбилизации или введения соразтворителей, что может негативно отразиться на фармакологических свойствах данных соединений. Таким образом, в литературном обзоре подробно обосновывается актуальность проблемы создания водорастворимых структур фуллерен-краситель и исследования фундаментальных закономерностей дезактивации возбужденных состояний красителей и фотодинамической активности гибридных структур с целью создания нового класса фотосенсибилизаторов.

В главе 2. «Материалы и методы» приведены структурные формулы водорастворимых производных фуллеренов и гибридных структур фуллерен-краситель, а также физические и биохимические методики исследований, используемые в диссертационной работе.

В главе 3 исследуются гибридные структуры фуллерен-краситель на основе нековалентных комплексов и ковалентных гибридных структур красителей с водорастворимыми полизамещенными производными фуллерена и их фотодинамические свойства в водных растворах. Именно в этих экспериментах автором убедительно показано, что фотохимическая активность комплексов фуллерен-краситель коррелирует с эффективностью тушения синглетных состояний красителя. Таким образом, фуллерены в этих комплексах выполняют роль катализаторов, обеспечивающих эффективную трансформацию энергии синглетного возбуждения в генерацию активных форм кислорода, являясь в некоторой степени моделями реакционных центров, осуществляющих преобразование энергии квантов света в биологических системах. На примере ковалентных структур фуллерен-флуоресцеин, имеющих различные заряды на красителе и фуллереновом фрагменте, показано, что электростатический фактор является одним из важнейших, контролирующих этот процесс, возможно, за счет изменения пространственной конфигурации гибридной структуры. Кроме того, показано, что образование комплексов фуллерен-краситель приводит к образованию в водных растворах ассоциатов и наноструктур, что может способствовать повышенному накоплению фотосенсибилизатора в опухоли. Одновременно наблюдается увеличение фотостабильности красителя в составе комплекса, что также имеет положительное значение при фотодинамической терапии.

В главе 4 с целью приближения условий эксперимента к биологическим структурам был исследован процесс протекания фотохимической реакции с участием нековалентных и ковалентных структур фуллерен-краситель в модельной системе на основе лецитиновых липосом. Автором диссертации обнаружено, что при введении в структуру липосом нековалентных комплексов фуллерен-краситель их фотохимическая активность существенно

снижается вследствие распада комплексов при их локализации в районе полярных головок липидов. При этом фотохимическая активность ковалентных диад фуллерен-флуоресцеин сохраняется неизменной и превышает фотохимическую активность нековалентного комплекса более чем в 5 раз. Это позволяет предположить, что при ведении в биологические структуры ковалентных диад фуллерен-краситель их фотодинамическая активность будет значительно превышать суммарную фотодинамическую активность исходного красителя и производного фуллерена.

В главе 5 осуществлена оценка фотодинамического действия гибридных структур фуллерен-флуоресцеин и фуллерен-рубоксил на биологические системы - на структуру кольцевой ДНК - плазмиды рЕТ-21 и на опухолевые клетки HeLa. При этом важно отметить, что исходные соединения производное фуллерена и красители не обладают каким-либо заметным цитотоксическим действием в отсутствии освещения. В результате проведенных исследований на уровне биологических систем было показано, что присоединение красителя флуоресцеина, не обладающего регистрируемым фотодинамическим действием, к фуллерену значительно повышает общую фотодинамическую активность диады фуллерен-краситель.

Таким образом, с помощью предлагаемого подхода можно существенно расширить спектр красителей, применяемых в фотодинамической терапии. Высокая фотодинамическая эффективность ковалентных конъюгатов фуллерен-краситель позволяет прогнозировать возможность создания на основе структур фуллерен-краситель высокоэффективных водорастворимых фотосенсибилизаторов нового поколения.

Автор непосредственно участвовал в обосновании и постановке основной части экспериментов, в их проведении и в обобщении результатов исследований.

Обоснованность и достоверность полученных результатов

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов, рекомендаций и заключений, полученных в диссертации, убедительно подтверждается подробным изложением экспериментального материала диссертационной работы, корректным обобщением и анализом полученных результатов и сопоставлением их с актуальными данными мировой научной литературы в данной области. Достоверность полученных результатов подтверждается также публикацией материалов исследований в 4 статьях в рецензируемых российских и зарубежных журналах, в двух главах в коллективных монографиях, представлением в виде 10 устных и стендовых докладов на конференциях и семинарах.

Новизна и научно-практическая значимость исследования

Диссертационная работа обладает необходимой **новизной**, которая определяется полученными в ней новыми результатами, в качестве основных следует отметить следующие:

- разработаны научно обоснованные принципы создания водорастворимых гибридных структур фуллерен-краситель на основе нековалентных комплексов и ковалентных диад фуллерен-краситель;
- показано значительное усиление фотодинамической активности гибридных структур фуллерен-краситель по сравнению с активностью индивидуальных молекул красителя и фуллерена в водных растворах и в структуре модельных биологических систем: в липосомах, при воздействии на ДНК и опухолевые клетки;
- различными методами оптической спектроскопии установлено, что усиление фотодинамического эффекта достигается за счет эффективной дезактивации возбужденных синглетных состояний красителя при переносе электрона или возбуждения с красителя на фуллерен, что значительно расширяет возможности выбора эффективного красителя для создания новых типов фотосенсибилизаторов.

Результаты данной работы представляют большой интерес для дальнейших фундаментальных и прикладных исследований фотодинамического действия водорастворимых диад фуллерен-краситель на биологические структуры с целью создания высокоэффективных фотодинамических препаратов нового поколения для применения в различных областях медицины. Применение данной работы можно рекомендовать в научно-исследовательских институтах биофизического, физико-химического, биологического и медицинского профиля Российской Академии наук, в научных учреждениях и организациях высшего образования медицинского профиля, в том числе в Институте фундаментальных проблем биологии РАН, кафедрах биофизики Физического и Биологического факультетов МГУ, Институте биохимии РАН, Институте химической физики им. Н.Н. Семенова РАН и Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина и в Московском научно-исследовательском онкологическом институте имени П. А. Герцена.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям

«Положения о порядке присуждения ученых степеней»

В целом диссертация А.Ю. Рыбкина **представляет собой законченную научно-исследовательскую работу** на актуальную тему. Результаты диссертационной работы позволяют сделать заключение, что на основе организованных водорастворимых структур фуллерен-краситель возможно создание нового класса фотосенсибилизаторов, отличающихся повышенной фотодинамической активностью. Показано, что фотодинамическая активность таких гибридных структур может регулироваться за счет изменения электростатических зарядов на молекулярных фрагментах фуллерена и красителя, при этом изменяется их растворимость и способность образовывать наноструктуры, что обуславливает их способность к селективному накоплению в опухолях. В результате проведенных экспериментов на биологических структурах различного уровня организации – на искусственных липосомальных мембранах, плазидах ДНК и опухолевых клетках убедительно показано эффективное фотодинамическое действие различных ковалентных структур фуллерен-краситель, даже если индивидуальный краситель не обладает фотодинамической активностью.

Оформление диссертации удовлетворяет требованиям ВАК РФ. **Автореферат** полностью соответствует содержанию диссертации.

Критические замечания

В качестве критических замечаний можно привести следующие:

1. В диссертационной работе экспериментально показано, что при объединении красителя и фуллерена в комплекс или в ковалентную молекулярную структуру и селективном фотовозбуждении красителя осуществляется перенос возбуждения или электрона с красителя на ядро фуллерена и последующая генерация на фуллереновом ядре супероксид анион-радикалов. Однако для ковалентных комплексов фуллерен-краситель, сохраняющих свою фотодинамическую активность в биологических мембранах, это продемонстрировано только с использованием красителей флуоресцеина и рубоксила, которые имеют синглетный уровень выше синглетного уровня фуллерена, что обеспечивает условие для переноса возбуждения. Но в этом случае возбуждение красителей

осуществляется в зеленой области спектра, что не удовлетворяет требованиям фотодинамической терапии. При возбуждении других красителей в красной области спектра (> 660 нм) условия для переноса возбуждения будут отсутствовать, и эффективность фотоактивации может значительно снизиться. В диссертационной работе продемонстрировано создание нековалентного комплекса фуллерен-Фотосенс, для которого наблюдается эффективная фотодинамическая активность при возбуждении красителя фотосенса на длине волны 670 нм. По-видимому, в структуре этого комплекса активация фуллеренового ядра осуществляется за счет переноса электрона. Однако для ковалентной структуры фуллерен-краситель при таком возбуждении в красной области спектра условия переноса электрона могут резко измениться, и ее фотодинамическая активность окажется малой. Желательно продемонстрировать возможность создания фотоактивных ковалентных структур фуллерен-краситель с возбуждением в красной области спектра непосредственно в диссертационной работе.

2. Положение 2, вынесенное на защиту (стр. 8), о том, что в составе водорастворимых гибридных структур на основе фуллерена и красителя происходит эффективная дезактивация не только триплетных, но и синглетных возбужденных состояний красителя за счет переноса электрона или возбуждения на фуллерен, слишком общее. Не понятно, между чем и чем происходит перенос электрона. Между красителем и фуллереном? Автору следовало бы уточнить формулировку положения.
3. На рис. 27 (стр. 102) представлены спектры поглощения флуоресцеина и ряда ковалентных конъюгатов производных фуллерена с красителями флуоресцеин и Рубоксил. Хорошо видно, что поглощение ППФ в красной области незначительно по сравнению со спектром красителя. Непонятно почему автор не определил эффективность передачи энергии с красителя на ППФ - очевидно, что эффективность этого процесса очень невелика.
4. При обсуждении оценки влияния конъюгатов ППФ(К)-флуоресцеин и ППФ-Рубоксил на структуру кольцевой ДНК плазмиды рЕТ-21 при облучении в полосе поглощения красителя (стр. 131-136) нет пояснения, почему для повреждения ДНК, кроме света необходимо присутствие NADH.
5. При образовании конъюгатов нарушается симметрия C_{60} . Нарушение симметрии

углеродного кластера изменяет квантовый выход триплетных состояний, редокс свойства молекулы, однако, в тексте не приводятся данные об этих изменениях. Квантовый выход триплетных состояний и редокс свойства важны для понимания механизма действия предлагаемых в работе фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии.

Заключение

Отмеченные недостатки не снижают общую положительную оценку представленной работы. Диссертация А.Ю. Рыбкина «Фотофизические и фотодинамические свойства водорастворимых гибридных структур фуллерен-краситель» и ее автореферат соответствуют требованиям Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а Александр Юрьевич Рыбкин несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02- биофизика.

Отзыв ведущей организации подготовлен кандидатом физико-математических наук, старшим научным сотрудником И.В. Шелаевым, обсужден и утвержден на заседании Лаборатории био- и нанофотоники Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН (протокол № 14 от 10 марта 2016 г.).

Старший научный сотрудник ИХФ РАН

к.ф.-м.н.

И.В. Шелаев



Собственноручную подпись
сотрудника И.В. Шелаева
удостоверяю
Секретарь Соткина

Сведения о ведущей организации

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук (ИХФ им. Н.Н. Семенова РАН).

Адрес: 119991 Москва, ул. Косыгина 4.

Телефон: (495)939-7200, 499-137-6320

Факс: (495)651-2191.

Адрес сайта: <http://www.chph.ras.ru>

Адрес электронной почты: icp@chph.ras.ru

Основные публикации сотрудников ведущей организации по профилю диссертации

А.Ю. Рыбкина за последние пять лет:

1. Lobanov A. V., Sultimova N.B., Levin P.P., Meshkov I.B., Melnikov M.Y. Aluminum Phthalocyanine on Silica Nanoparticles: Aggregation and Excited States // *Macromolecules*. 2015. Vol. 8, № 3. P. 279–283.
2. Nekipelova T.D., Shelaev I.S., Gostev F.E., Nadtochenko V.A., Kuzmin V.A. Stepwise versus Concerted Mechanism of Photoinduced Proton Transfer in sec-1,2-Dihydroquinolines: Effect of Excitation Wavelength and Solvent Composition // *J. Phys. Chem. B*. 2015. Vol. 119, № 6. P. 2490–2497.
3. Semenov A.Y., Petrova A.A., Mamedov M.D., Nadtochenko V.A. Electron transfer in photosystem I containing native and modified quinone acceptors // *Biochem*. 2015. Vol. 80, № 6. P. 654–661.
4. Rudenko T.G., Shekhter A.B., Guller A.E., Aksenova N.A., Glagolev N.N., Ivanov A. V., Aboyants R.K., Kotova S.L., Solovieva A.B. Specific Features of Early Stage of the Wound Healing Process Occurring Against the Background of Photodynamic Therapy Using Fotoditazin Photosensitizer-Amphiphilic Polymer Complexes // *Photochem. Photobiol*. 2014. Vol. 90, № 6. P. 1413–1422.
5. Zhiyentayev T.M., Boltaev U.T., Solov'eva A.B., Aksenova N.A., Glagolev N.N., Chernjak A. V., Melik-Nubarov N.S. Complexes of Chlorin e6 with Pluronics and Polyvinylpyrrolidone: Structure and Photodynamic Activity in Cell Culture // *Photochem. Photobiol*. 2014. Vol. 90, № 1. P. 171–182.

6. Михайлов К.М., Шелаев И.В., Гостев Ф.Е., Ящук Ю.П., Тюрин В.С., Белецкая И.П., Надточенко В.А. Фемтопикосекундная релаксация бис-порфирина цинка, связанного триазольным мостиком // *Химия высоких энергий*. 2014. Vol. 48, № 4. P. 319.
7. Надточенко В.А., Шелаев И.В., Мамедов М.Д., Шкурапатов А.Ю., Семенов А.Ю., Шувалов В.А. Первичные ион-радикальные пары в комплексах фотосистемы II (обзор) // *Биохимия*. 2014. Vol. 79, № 3. P. 263–272.
8. Ударцева О.О., Лобанов А.В., Андреева Е.Р., Дмитриева Г.С., Мельников М.Я., Буравкова Л.Б. Фотофизические свойства и фотодинамическая активность нанокompозитных фталоцианинов алюминия // *Биофизика*. 2014. Vol. 59, № 6. P. 1051–1060.
9. Gradova M.A., Lobanov A. V. Photophysical Properties and Aggregation Behavior of Transition Metal Tetraphenylporphyrin Tetrasulfonate Complexes in Microheterogeneous Media // *Macroheterocycles*. 2013. Vol. 6, № 4. P. 340–344.
10. Lygo O.N., Shelaev I. V., Gostev F.E., Nekipelova T.D., Khodot E.N., Tsentalovich Y.P., Titov A.A., Kuzmin V.A., Sarkisov O.M. Effect of the excitation wavelength and the structure of nitrated 1,2-dihydroquinolines on dynamics of primary photophysical and photochemical processes // *High Energy Chem*. 2013. Vol. 47, № 5. P. 230–236.
11. Соловьева А.Б., Аксенова Н.А., Глаголев Н.Н., Сорокатый А.А., Толстых П.И., Иванов А.В. Использование фотодитазина и наночастиц гидроксиапатита при фотодинамической терапии длительно незаживающих ран // *Российский биотерапевтический журнал*. 2013. Vol. 12, № 2. P. 79.
12. Aksenova N.A., Oles T., Sarna T., Glagolev N.N., Chernjak A. V., Volkov V.I., Kotova S.L., Melik-Nubarov N.S., Solovieva A.B. Development of novel formulations for photodynamic therapy on the basis of amphiphilic polymers and porphyrin photosensitizers. Porphyrin-polymer complexes in model photosensitized processes // *Laser Phys*. 2012. Vol. 22, № 10. P. 1642–1649.
13. Solov'eva A.B., Aksenova N.A., Glagolev N.N., Melik-Nubarov N.S., Ivanov A. V., Volkov V.I., Chernyak A. V. Amphiphilic polymers in photodynamic therapy // *Russ. J. Phys. Chem. B*. 2012. Vol. 6, № 3. P. 433–440.

14. Семенов А.Ю., Шелаев И.В., Гостев Ф.Е., Мамедов М.Д., Шувалов В.А., Саркисов О.М., Надточенко В.А. Первичные стадии переноса электрона и энергии в фотосистеме 1: эффект длины волны импульса возбуждения // Биохимия. 2012. Vol. 77, № 9. P. 1219–1229.
15. Соловьева А.Б., Аксенова Н.А., Толстых П.И., Глаголев Н.Н., Мелик-Нубаров Н.С., Иванов А.В., Волков В.И., Черняк А.В., Систер В.Г. Комплексы фотосенсибилизаторов с полимерами - современные препараты для фотодинамической терапии // Лазерная медицина. 2012. Vol. 16, № 4. P. 9–15.
16. Galetskiy D.N., Lohscheider J.N., Kononikhin A.S., Kharybin O.N., Popov I.A., Adamska I., Nikolaev E.N. Light stress photodynamics of chlorophyll-binding proteins in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membranes revealed by high-resolution mass spectrometric studies // Russ. J. Bioorganic Chem. 2011. Vol. 37, № 1. P. 105–118.
17. Romanov A.N., Gularyan S.K., Polyak B.M., Sakovich R.A., Dobretsov G.E., Sarkisov O.M. Electronically excited states of membrane fluorescent probe 4-dimethylaminochalcone. Results of quantum chemical calculations // Phys. Chem. Chem. Phys. 2011. Vol. 13, № 20. P. 9518.
18. Толстых П.И., Соловьева А.Б., Тамразова О.Б., Аксенова Н.А., Кулешов И.Ю., Сорокатый А.А. Современные аспекты фотодинамической терапии гнойных и хронических ран фотодитазином, комплексированным с амфифильными полимерами // Московский Хирургический Журнал. 2011. № 3. P. 69–72.