

Голові разової спеціалізованої вченої ради
Державної наукової установи
«Науково-технологічний комплекс
«Інститут монокристалів»
Національної академії наук України»
доктору хімічних наук, професору
Вікторії ЛПСОН

РЕЦЕНЗІЯ

кандидата хімічних наук, старшого дослідника,
старшого наукового співробітника відділу органічної та біоорганічної хімії
Державної наукової установи «Науково-технологічний комплекс
«Інститут монокристалів» Національної академії наук України»

Горобця Миколи Юрійовича

на дисертаційну роботу **Кобзева Дмитра Володимировича**
«Довгохвильові галогеновані флуоресцентні поліметинові барвники
для медико-біологічних застосувань»,

подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії
за спеціальністю 102 Хімія, Галузь знань 10 Природничі науки.

1. Актуальність дисертаційної роботи та її зв'язок з державними чи галузевими науковими програмами

Робота Кобзева Дмитра Володимировича є логічним продовженням досліджень, які систематично проводяться у відділі люмінесцентних матеріалів та барвників ім. Б.М. Красовицького ДНУ «НТК «Інститут монокристалів» Національної академії наук України. Ці роботи спрямовані на розробку функціональних матеріалів, люмінесцентних барвників із заданими фізико-хімічними характеристиками. Підтримуючи традиційний підхід до досліджень відділу, автор дисертації вирішує фундаментальні питання впливу будови молекул на властивості барвників із метою розробки сполук, оптимально придатних для конкретних практичних застосувань. Своєю науковою роботою автор робить власний суттєвий внесок як у фундаментальну, так і в практичну спрямованість розвитку наукової школи відділу.

Тож мета дисертаційної роботи складається з вирішення двох питань: фундаментального характеру – впливу важких атомів галогенів, таких як бром та йод, на властивості поліметинових барвників, та практичного застосування цих барвників у медицині: тераностики, фотодинамічної терапії (ФДТ) та фотоімунотерапії (ФІТ).

ФДТ – це досить новий підхід в медицині, який швидко розвивається. В ньому використовуються фотоактивний агент, фотосенсибілізатор (ФС), який є нетоксичним без фотозбудження, тобто у темряві. Коли він потрапляє у клітину патогену, то під дією світла з довжиною хвилі, яка відповідає його спектру погли-

нання, він здатен генерувати синглетний кисень, який і вбиває клітину патогену. Тож здатність фотосенсибілізатора генерувати синглетний кисень є дуже затребуваною властивістю для ФДТ. Вплив важких атомів галогену, або «heavy atom effect», як правило, проявляється в зниженні квантового виходу флуоресценції й одночасному суттєвому підвищенні квантового виходу синглетного кисню. До цієї роботи Дмитра Кобзева вважалося, що виключення з цього правила є поодинокими і мають окремі специфічні пояснення.

Як чітко показано автором у літературному огляді його дисертації, зазначені питання в наш час розглядаються на сторінках авторитетних міжнародних фахових видань. Тож актуальність як фундаментальної, так і прикладної складових мети роботи не викликає жодного сумніву.

2. Ступінь обґрунтованості наукових положень в дисертації, їхні достовірність та новизна

Вибір для дослідження поліметинових барвників, а саме гептаметинціанінів, є дуже вдалим і добре обґрунтованим. Завдяки їхньому інтенсивному поглинанню в ближньому інфрачервоному діапазоні, ці барвники можуть розглядатися як перспективні ФС для ФДТ, адже ближнє інфрачервоне світло найбільш ефективно (найглибше) проникає у тканини людини. Отже, ФС, які працюють в цьому діапазоні, мають потенціал застосування для боротьби з патогенами на глибині від 2 до 4 см, тобто мають ширше застосування. У той час як глибина проникнення короткохвильових ФС обмежується 4-6 мм через інтенсивне поглинання світла цього діапазону біомолекулами, що обмежує застосування короткохвильових ФС для лікування лише захворювань шкіри та доступних для опромінення ділянок слизових оболонок.

Молекулярна платформа обраних барвників надає синтетичну можливість варіювання фізико-хімічних властивостей за рахунок зміни природи замісників, введення реакційноздатних груп та спейсерів, а також отримання ковалентних кон'югатів з біомолекулами. Все це дозволило авторові широко варіювати структуру досліджуваних барвників і в повній мірі досягти цілей дослідження.

Цікаво, що єдиний недолік обраної молекулярної платформи, а саме низьку фототоксичність ціанінів, автор перетворив на перевагу. Адже з використанням «ефекту важкого атому» він зміг отримати сполуки цього ряду зі значно посиленою фототоксичністю. Таким чином автор особливо яскраво демонструє можливості раціонального використання цього ефекту як інструменту для оптимізації структури барвника з метою надання йому бажаних хіміко-фізичних характеристик. Визначення залежності структура-властивість, а саме закономірності впливу атомів галогену, їхньої кількості та положення на спектрально-флуоресцентні властивості та на спроможність генерувати синглетний кисень – все це зрештою й надало авторові можливість отримати практично значущі результати – одержати ряд ефективних ціанінових барвників для флуоресцентної візуалізації, діагностики та фототерапії. Попри високий рівень актуальності теми, в літературі існує на диво

небагато робіт, в яких систематично вивчається ефект важкого атому на баланс флуоресценції барвників із їхньою здатністю генерувати синглетний кисень. Також із літературного огляду в дисертації стає зрозуміло, що наразі немає загальноприйнятої концепції, здатної раціоналізувати всі спостережені прояви цього ефекту. Тобто сама постановка задачі дослідження має високий рівень новизни.

Автор виокремив шість пунктів наукової новизни своєї роботи. Вони – логічні й безсуперечні. Як рецензент мушу зазначити, що існує додатковий загальний пункт наукової новизни, який стосується нового розуміння ефекту важкого атому. Автор не спростовує загальноприйняте правило, що введення важких атомів галогену спричиняє зниження квантового вихідну флуоресценції та підвищення квантового виходу синглетного кисню. Але з роботи Дмитра Володимировича стає зрозуміло, що такий вплив можна очікувати для структурно-жорстких, конформаційно-бідних барвників, з використанням яких це правило і було сформульовано. Працюючи з гнучкими, лабільними структурами поліметинових барвників, автор знайшов інші закономірності, які в цій групі сполук дають результати, не очікувані з точки зору загальноприйнятої концепції. Так, введення важких атомів галогену у випадку сполук, які досліджувалися в його роботі, приводить до підвищення квантового виходу флуоресценції. Але цей вплив має складний і нелінійний характер, адже залежить від природи галогену (хлор, бром або йод), числа атомів галогену та їхнього положення як замісників в молекулі барвника. Цей нелінійний характер автор пояснює внеском ряду факторів – не лише внутрішніми впливами електронної природи замісника на шляхи конверсії фотозбудження (як це робиться у загальноприйнятій концепції), але й конформаційними змінами, а також, як не дивно, тим, що важкі атоми галогенів є важкими! Фрагменти молекул, навантажені важкими замісниками, складніше рухати. Це у свою чергу впливає на жорсткість молекулярного каркасу, а отже, й на баланс шляхів конверсії енергії збудження. Додаткові складнощі для вивчення та інтерпретації результатів накладає й можливість змінення процесів агрегації молекул через введення атомів галогенів, що також враховується автором дисертації.

Тож нове розуміння взаємозв'язків будова-властивість, одержане в ході дослідження, дозволило автору створити нові барвники, перспективні для діагностики та одночасного лікування ракових пухлин, фотоерадикації бактерій, що може допомогти обійти проблему резистентності бактерій до антибіотиків *in vitro*. Також одержаний у роботі кон'югант поліметинового барвника з моноклональним антитілом продемонстрував *in vivo* на мишах свій значний потенціал для діагностики та лікуванні раку, ставши тим самим остаточним практичним доказом авторської концепції.

Високий рівень експериментальних досліджень, на яких базуються висновки, отримані в дисертації, компетентність автора та наукового керівника, логічність аргументації сформульованих наукових положень не залишають місця жодним сумнівам в їхній всебічній обґрунтованості та достовірності.

3. Загальні дані про структуру дисертації та аналіз її змісту

Рецензована дисертація є результатом завершеного наукового дослідження із чітко сформульованою метою, оглядом стану проблеми, експериментами та обговоренням їхніх результатів, висновками та переліком цитованої літератури.

Структура роботи є класичною. У Вступі коротко викладена актуальність тематики дослідження, сучасні тенденції в дослідженнях, спрямованих на розробку нових флуоресцентних барвників з певними властивостями для їхнього подальшого застосування в тераностиці, ФДТ та ФІТ. Мета роботи конкретна, вимірювана, добре зрозуміла та лаконічно сформульована.

Перша частина дисертації містить літературний огляд, в якому висвітлюється питання впливу атомів галогену на властивості поліметинових барвників та біомедичні застосування таких барвників.

Друга частина присвячена синтезу досліджуваних барвників, встановленню їхньої структури та чистоти. Експериментальна робота описана з високим рівнем деталізації та прискіпливим обговоренням деталей та результатів синтетичних процедур із демонстрацією та обговоренням спектрів продуктів, що надає практичну можливість відтворити ці результати, використати їх для подальших досліджень. Окремо варто відзначити величезний обсяг синтетичної роботи, яка була проведена в ході дослідження. Це дозволило отримати не лише величезну кількість нових барвників із потенціалом подальшого застосування, але й на базі цього різноманіття галогенованих похідних гептаметинціанів блискуче виконати поставлене завдання – всебічно вивчити вплив важких атомів галогенів на властивості цих барвників.

Третя частина присвячена аналізу впливу введення важких атомів галогену в кінцевий індоленіновий гетероцикл гептаметинціанінового барвника на спектрально-люмінесцентні властивості, квантові виходи флуоресценції і генерації синглетного кисню. Ця й наступна частини містять аргументацію та обговорення експериментів та їхніх результатів, що стали підґрунтям більшості наукових положень сформульованих у висновках дисертації.

Четверта частина стосується лабораторних моделювань застосування розроблених в роботі барвників для тераностики та фотодинамічної терапії *in vitro* і *in vivo*. Тут автором висвітлено найбільш вражаючі результати з високим потенціалом практичного застосування в медицині. Наприкінці дисертації зібрано всі експериментальні протоколи, висновки та літературні джерела.

Розглянута робота має всі формальні ознаки дисертації на здобуття ступеня доктора філософії, містить необхідні розділи, і загалом за структурованістю та об'ємом повністю відповідає вимогам до зазначених дисертацій.

Що стосується сутності роботи, то її назва, формулювання мети роботи, опис експериментів та обговорення результатів викладено у зрозумілому науковому стилі. Робота містить висновки, сутність яких передає наукові здобутки, отримані автором у роботі та підтверджені величезним обсягом експериментальних даних. Висновки в роботі представлені у розгорнутому та дуже докладному вигляді. З

одного боку, це дуже зручно для розуміння та оцінки наукового доробку дисертанта, але з іншого – це суперечить загальноприйнятій вимозі лаконічності до їхнього формулювання.

Загалом робота дуже легко читається. Попри її складний міждисциплінарний характер, дисертація не є перевантаженою, тут немає нічого зайвого, долученого з метою збільшення кількості сторінок. Авторіві вдалося викласти матеріал послідовно, логічно, зрозуміло. Це свідчить про великий обсяг кропіткої праці з літературою, виконаний автором. Кожна суміжна сфера дослідження представлена в літературному огляді та обговорена при аналізі результатів дослідження. Інформація добре структурована, проілюстрована та підтверджена посиланнями на нові, найновіші тематичні огляди та статті в провідних виданнях.

4. Повнота опублікування результатів дисертації, кількість наукових публікацій та конкретний особистий внесок здобувача

Матеріали дисертації викладено в чотирьох статтях, опублікованих у міжнародних виданнях високого рівня. Основні наукові здобутки та положення дисертації висвітлено на сторінках журналу *Dyes and Pigments* (у 2021 та 2023 роках) – профільного видання світового рівня, де розглядаються питання розробки і вивчення люмінофорів та барвників. Саме в цих публікаціях особистий внесок автора дисертації є визначальним. У третій статті опубліковано результати дослідження структури вихідних сполук, синтезованих автором і використаних ним в дисертації для синтезу цільових барвників (*Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications*, 2021). У четвертій статті 2020 року в журналі *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* використано вихідну сполуку, яка була синтезована автором і використовувалася ним також в дисертаційній роботі для синтезу цільових барвників.

Особистий внесок автора у всі ці наукові публікаціях включає синтез або участь у синтезі досліджуваних речовин, що в повній мірі відповідає його кваліфікації із спеціальності 102 Хімія у галузі знань 10 Природничі науки і підтверджує його професіоналізм у цьому питанні. Окрім суто синтетичної роботи, внесок автора також стосується визначення спектрально-люмінесцентних характеристик та квантового виходу синглетного кисню сполук, *in vivo* досліджень. Автор також брав участь в обробці, візуалізації та обговоренні результатів досліджень, підготовці чернеток публікацій.

Таким чином вважаю, що основні наукові положення дисертації в повній мірі викладено автором в фаховій науковій літературі, тобто вони вже пройшли незалежне рецензування і доступні для широкого загалу науковців, які працюють в сферах, близьких до тематики дисертації. Кількість публікацій, їхній рівень та особистий авторський внесок здобувача є цілком достатніми.

5. Загальна оцінка дисертації та зауваження

Рецензована дисертація за актуальністю її тематики, науковою новизною одержаних результатів та їхнім практичним значенням безумовно заслуговує найвищої оцінки. Мета та завдання дослідження а також викладені у роботі наукові положення в повній мірі обґрунтовано. Зміст матеріалу викладено логічно та добре структуровано. В цілому дисертаційна робота є завершеною науковою працею, з якої зрозуміло, що її автор є кваліфікованим науковцем.

Викладені далі зауваження стосуються не суті наукових положень дисертації, а лише деяких вад її оформлення і стилістики; питання, що ставляться, мають уточнювальний характер.

Взагалі автор продемонстрував дуже гарну роботу з аналізу наукової літератури, але припустився деяких помилок при оформленні посилань.

1. Назви статей в посиланнях написані по-різному – в деяких випадках всі слова назви, окрім першого, написані з маленької літери, в інших – з великої.
2. Зустрічаються помилки в скороченнях назв журналів (посилання [18] та [46]) або неповне посилання – [58].
3. Говорячи про добре відомі флуоресцентні барвники на початку огляду літератури автор більшою мірою логічно посилається на відповідні огляди з описом того чи іншого класу сполук, однак посилання [3] та [5] ведуть до наукових статей (не оглядів), що не дає загального уявлення про широту використання цих сполук як флуоресцентних барвників.
4. Посилання [4] на кумарини як клас флуоресцентних сполук – стаття про кумарини, але не про флуоресцентні, а про біоактивні.
5. Посилання [16] та [17] переплутані місцями.
6. Незрозуміло, яке відношення має посилання [35] до рисунку 1.5, під котрим воно надано.
7. Дисгармонійно виглядають посилання на огляди [53,54] по сонодинамічній терапії у розділі 1.3.2, присвяченому огляду фотодинамічної терапії.
8. Питання до рисунку 1.5 в літературному огляді: як можна трактувати зазначені квантові виходи флуоресценції та генерації синглетного кисню для сполуки 1.4, коли разом ці значення складають більше 100%?
9. На сторінці 41, на Схемі 2.1. існує плутанина з кількістю вихідних сполук в описаних реакціях, а також переліком замісників. Із подальшого обговорення витікає, що продукти **2.4g** та **2.4h** були отримані одночасно із однієї реакції, виходячи з 3-бромфенілгідразину **2.3g**. Для уникнення непорозумінь цей шлях реакції варто було окремо зазначити на схемі.
10. Сторінка 47 «triplet at 4.59 ppm of NCH_2 and triplet at 2.62 ppm of CH_2SO_3 » – відповідно до рисунку 2.3 з демонстрацією ПМР спектру сполуки **2.8** вказані сигнали важко назвати триплетами. Незалежно від можливих вад роздільної спроможності цього спектру, виходячи зі структури продукту,

чи автор вважає, що можливо очікувати появу триплетів у спектрі для вказаних груп?

11. Сторінка 47 «In compound **2.5c**, the positive charge is localized on the nitrogen atom, which is caused by its quaternization». Якими фактами підтверджується це твердження?
12. На сторінці 52 після схеми 2.8 обговорюються різниця у реакційній здатності проміжних сполук в синтезі несиметричних йодованих барвників. Однак на схемі відсутні структури сполук **2.8** та **2.9** про які йдеться в обговоренні. Тому це питання потребує пояснення: яка саме проблема виникла з різною реакційною здатністю цих сполук і як вона була вирішена у роботі?
13. Квантовий вихід генерації синглетного кисню використовується в дисертації і в науковій літературі як стала характеристика фотосенсибілізатора. Вимірювання відбуваються в метанолі. Якщо я правильно розумію, синглетний кисень утворюється із кисню повітря, розчиненого в цьому розчиннику. Тому питання, чи не залежать результати вимірювання від вмісту кисню в метанолі?
14. В розділі 3.5 автор оперує термінами «normal heavy atom effect» і «anomalous heavy atom effect». Розуміючи що обидва ефекти є природнім проявом змін шляхів затухання енергії фотозбудження під впливом важких атомів галогенів, чи не міг би дисертант сформулювати нове загальне правило або навіть закон про вплив важкого атому?
15. Розділ 3.6: про що говорять надані квантово-механічні розрахунки і як їхні результати були використані в дослідженні?
16. Стосовно досліджень протибактеріальної фотодинамічної активності: експерименти проводилися з попереднім інкубуванням клітин разом з фотосенсибілізатором впродовж 30 хвилин у темряві. Відомо, що цей час може істотно впливати на результати фотодинамічного знищення бактерій, що пов'язано зі швидкістю поглинання барвника клітинами. Чому в дослідженні було обрано саме такий час попереднього інкубування і чи не проводилися експерименти з його збільшенням?
17. Вади термінології та невдалі вислови або одруківки:
 - bacterial treatment
 - стор. 39 «as the photosensitizer for photoimmunotherapy thus far. [121-125].»
 - стор. 42 «stronger conditions»
 - стор. 43 «moderate yields (42–75%)», «moderate yield (60%)» на стор. 45
 - «H» в назвах сполук часто написано без курсиву, наприклад, «trimethyl-3H-indol» - стор. 46, 47
 - стор. 48 «during the reaction was occured»
 - стор. 54 «Spectral purity of all synthesized dyes were determined by LCMS analysis»

- Рис. 4.4. (стор. 73) і далі Рис. 4.7., 4.8., 4.10., 4.11 термін «light exposure» був некоректно застосований замість «light dose» (J/cm^2).

Втім, не маю сумніву, що кваліфікація дисертанта є достатньо високою, щоб з'ясувати означені питання у ході його публічного захисту.

Відсутність порушень академічної доброчесності

У дисертації та наукових публікаціях здобувача відсутні порушення академічної доброчесності.

6. Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Вважаю, що дисертаційна робота Кобзева Дмитра Володимировича «Довгохвильові галогеновані флуоресцентні поліметинові барвники для медико-біологічних застосувань» за актуальністю, новизною, рівнем і достовірністю отриманих наукових результатів відповідає вимогам Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії, який затверджено постановою Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 № 44, а її автор, Кобзев Дмитро Володимирович, заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 102 Хімія в галузі знань 10 Природничі науки.

Офіційний рецензент:

старший науковий співробітник відділу органічної та біоорганічної хімії
Державної наукової установи «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» Національної академії наук України», кандидат хімічних наук, старший дослідник

Микола ГОРОБЕЦЬ

Підпис к.х.н., ст. досл. Горобця М.Ю. завіряю

Вчений секретар
к.х.н., ст. досл.



Іліас ЩЕРБАКОВ