

*На правах рукописи*



САННИКОВА Наталья Эдуардовна

РАЗВИТИЕ МЕТОДОВ ИМПУЛЬСНОЙ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ  
С ФОТОВОЗБУЖДЕНИЕМ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ  
КОМПЛЕКСОВ БИОМОЛЕКУЛ С ФОТОАКТИВНЫМИ  
ЛИГАНДАМИ

1.3.17 - химическая физика, горение и взрывы,  
физика экстремальных состояний вещества

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Новосибирск – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
Институте «Международный томографический центр» Сибирского отделения  
Российской академии наук

<b>Научный руководитель</b>	<b>Крумкачева Олеся Анатольевна</b> Доктор физико-математических наук, в.н.с. МТЦ СО РАН
<b>Официальные оппоненты</b>	<b>Чумакова Наталья Анатольевна</b> Доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории кинетики механохимических и свободно-радикальных процессов им. В.В. Воеводского Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, г. Москва <b>Марьясов Александр Георгиевич</b> Кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории магнитной радиоспектроскопии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск
<b>Ведущая организация</b>	Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», г. Казань

Защита диссертации состоится “25” февраля 2026 года в 15-00 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.150.01 при ФГБУН Институте химической кинетики и горения Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН) по адресу: 630090, Новосибирск, ул. Институтская, д. 3, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИХКГ СО РАН и на сайте <http://Kinetics.nsc.ru>. Текст автореферата размещён на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации по адресу: <http://vak.minобрнауки.gov.ru>.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 630090, г. Новосибирск, Институтская, 3, ИХКГ СО РАН, учёному секретарю диссертационного совета 24.1.150.01; e-mail: [ref\\_dissovet@kinetics.nsc.ru](mailto:ref_dissovet@kinetics.nsc.ru).

Автореферат разослан “ ” января 2026 года

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук

И. П. Поздняков

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования**

Исследование структуры и функций белков, нуклеиновых кислот и их комплексов с терапевтическими лигандами является важной и актуальной задачей, поскольку тесно связано с разработкой средств терапии социально значимых заболеваний. Высокоинформационным экспериментальным методом исследования структуры аморфных материалов и биомолекул в нанометровом диапазоне является метод импульсного электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в комбинации с методом направленного введения спиновых меток. Ключевой особенностью импульсного ЭПР является возможность исследовать структуры объектов, обладающих широким конформационным разнообразием. Важно отметить, что ЭПР может применяться для изучения биомолекул независимо от их размера. Использование фотовозбужденного триплетного состояния в качестве спиновой метки представляет собой принципиально новый подход в ЭПР-спектроскопии [1, 2]. Такой подход открывает новые перспективы для изучения структуры комплексов биомолекул, связанных с фотоактивными лигандами, что имеет особую значимость для разработки систем, используемых в фотодинамической терапии (ФДТ).

ФДТ является инновационным методом лечения рака, базирующимся на применении фотосенсибилизаторов (ФС) — специфических молекул, которые, будучи нейтральными в обычных условиях, при активации светом и при наличии кислорода способны генерировать активные формы кислорода, вызывающие окислительный стресс и последующую гибель раковых клеток. Одним из ключевых преимуществ ФДТ перед традиционными методами лечения является ее неинвазивность, высокая селективность, сниженный риск побочных эффектов, характерных для химио- и радиотерапии. Важной задачей на пути повышения эффективности ФДТ является выбор оптимальных фотосенсибилизаторов и разработка методов их целенаправленной доставки. Ключевое значение в этом процессе играет взаимодействие фотолигандов с биомолекулярными мишениями, среди которых особо выделяют ДНК, в том числе структуры G-квадруплексов и человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), выполняющий важную функцию в транспортировке и распределении терапевтических препаратов. Человеческий сывороточный альбумин, обладая способностью нековалентно связываться с широким спектром лигандов через несколько сайтов разной специфичности, выступает как эффективный носитель для фотосенсибилизаторов [3]. Это особенно актуально для фотосенсибилизаторов с низкой водорастворимостью. В то же время разработка лигандов, структурно ориентированных на взаимодействие с неканоническими последовательностями ДНК такими как G-квадруплексы, представляет собой перспективное направление для усовершенствования противораковой терапии [4]. Таким образом,

понимание механизмов взаимодействия фотолигандов как с ЧСА, так и с уникальными структурами ДНК открывает путь к созданию более целенаправленных и эффективных средств для ФДТ. В этом контексте значительным потенциалом обладает метод дипольной спектроскопии ЭПР, поскольку он позволяет измерять полное вероятностное распределение расстояний между селективно введенными спиновыми метками в диапазоне от 1.5 до 8 нм без ограничений по размеру исследуемой системы. Получаемые распределения напрямую отражают весь ансамбль конформаций, существующих в образце, что идеально подходит для исследования объектов с полиморфизмом.

### **Степень разработанности темы исследований**

До недавнего времени практически все исследования дипольной ЭПР-спектроскопии проводились с использованием спиновых меток на основе стабильных радикалов [1, 2, 5]. С 2014 года начали появляться статьи, в том числе и работы, выполненные соискателем, демонстрирующие применение фотовозбужденных триплетных состояний молекул в качестве спиновых меток для структурных исследований [1, 2, 5]. Ключевой особенностью таких фотоиндуцируемых меток является неравновесная поляризация электронных спинов, из-за чего интенсивность сигнала ЭПР триплетного состояния может существенно превышать сигнал стабильных радикалов. Применение фотовозбужденного триплетного состояния как спиновой метки для детекции может значительно усилить наблюдаемые сигналы и сократить время накопления данных. Другое их преимущество заключается в возможности целенаправленного возбуждения лазерным импульсом в рамках ЭПР-последовательности, что позволяет, например, заменить микроволновый импульс накачки в экспериментах дипольной ЭПР-спектроскопии лазерным импульсом. Таким образом, фотоиндуцируемые спиновые метки могут выступать как в роли наблюдаемых спинов, так и в роли спинов накачки в экспериментах дипольной ЭПР спектроскопии, предоставляя существенные преимущества по сравнению с традиционными (стабильными) парамагнитными метками. Несмотря на вышеперечисленные преимущества, первая демонстрация применимости подхода использования триплетного состояния молекулы одновременно в качестве ФС и спиновой метки в биологически значимом комплексе была реализована нами недавно [5], что подчеркивает значимость и актуальность данного исследования.

### **Цель работы**

Целью данного диссертационного исследования является развитие и оптимизация импульсных методов ЭПР-спектроскопии с фотовозбуждением для исследования пространственной структуры комплексов биомолекул с фотоактивными лигандами, перспективными для применения в фотодинамической терапии.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать и реализовать подходы ЭПР-спектроскопии для исследования взаимодействия фотоактивных лигандов с ДНК и анализа светоиндуцированных структурных изменений в таких комплексах.
2. Применить разработанные подходы для исследования структурной организации и светоиндуцированных изменений в комплексе теломерной G-квадруплексной ДНК (HTel-22) с катионным порфирином TMPyP4 (мезо-тетра(N-метил-4-пиридин) порфирином).
3. Адаптировать и применить методы импульсной дипольной ЭПР-спектроскопии с фотоиндуцированными спиновыми метками для установления локализации сайтов связывания фотоактивных лигандов в комплексах с белками.
4. Охарактеризовать структурные особенности связывания анионных, нейтральных и катионных тетрапиррольных фотосенсибилизаторов с человеческим сывороточным альбумином.
5. Исследовать эффективность и ограничения метода динамической развязки с интегрированием множественных эхо-сигналов при его применении в экспериментах дипольной ЭПР-спектроскопии с фотовозбужденными триплетными состояниями.

### **Научная новизна**

Впервые предложен подход на основе данных дипольной ЭПР-спектроскопии для получения структурной информации о комплексах фотоактивных молекул с G-квадруплексными структурами ДНК. Представленный подход дополняет существующие биофизические методы и дает уникальные возможности для отслеживания динамических изменений топологии G-квадруплексов ДНК при фотооблучении, а также для определения локализации фотосенсибилизатора в таких комплексах. Так, были определены позиции связывания TMPyP4 с G-квадруплексом HTel-22, включая впервые экспериментально подтвержденный сайт APT2, расположенный на нижней тетраде антипараллельной формы. Впервые было показано разворачивание исходной G-квадруплексной структуры и формирование димерных форм в результате фотооблучения.

Впервые была построена масштабная, детальная, экспериментально подтвержденная карта сайтов связывания лигандов, перспективных для фотодинамической терапии, с ЧСА. Установлено, что тетрапиррольные фотосенсибилизаторы различного зарядового состояния формируют комплексы с альбумином в нескольких сайтах, включая как традиционные участки (Садлоу I и гем-сайт), так и нетипичные области, ранее не выявленные другими методами. Впервые было показано, что для анионных ФС (ФеоА: ((3S,4S)-9-этенил-14-этил-21-(метоксикарбонил)-4,8,13,18-тетраметил-20-оксо-3-форбинпропановая кислота, TCPP: мезо-тетра(4-карбоксифенил)порфирин, DCPP: 5,15-ди(п-карбоксифенил)порфирин, TSPP: мезо-тетра-(4-сульфонатофенил)порфирин) сайты гема и Садлоу I участвуют в связывании одновременно, однако их относительная

аффинность существенно зависит от структуры лиганда. Для нейтрального ФС THPP (5,10,15,20-тетракис(4-гидроксифенил) порфирин) впервые показано, что комплекс с ЧСА формируется в нескольких положениях, доминирующим среди которых является сайт вблизи гем-сайта, наряду с дополнительными сайтами на поверхности белка. Для катионных порфиринов (C3Ру: 5,10,15,20-тетракис(4-(4-пиридил-*p*-бутиноил)оксифенил)порфирин тетрабромид и C5Ру: 5,10,15,20-тетракис(4-(6-пиридил-*p*-гексаноил)оксифенил)порфирин тетрабромид) с помощью дипольной ЭПР-спектроскопии впервые было показано, что они связываются на поверхности альбумина, занимая несколько участков. Независимо от длины периферических групп, их доминирующий сайт расположен в субдомене IV, вблизи Cys34.

Для экспериментов светоиндуцируемой дипольной ЭПР-спектроскопии впервые были продемонстрированы возможности, а также ограничения подхода, основанного на применении блоков динамической связки. Впервые показано, что расщепление в нулевом магнитном поле (РНП) и диполь-дипольные взаимодействия в спиновой паре вносят вклад в электронную спиновую декогеренцию при применении блоков динамической связки для фотовозбужденных триплетных состояний. Впервые продемонстрировано, что применение блоков динамической связки позволяет сократить время накопления сигнала примерно в шесть раз по сравнению со стандартным методом при сохранении корректных распределений расстояний в экспериментах дипольной ЭПР-спектроскопии с фотоиндуцированными метками. Кроме того, впервые определены условия для получения максимальной эффективности применения блоков динамической связки для фотоиндуцируемых меток: предложенный подход особенно эффективен для низкоконцентрированных образцов и слабых сигналов, то есть в тех случаях, где повышение чувствительности наиболее востребовано.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные результаты вносят важный вклад в разработку новых экспериментальных методов химической физики и открывают новые возможности изучения структуры, функций комплексов сложных биомолекул.

Так, предложенный ЭПР-подход применим не только к коротким моделям G-квадруплексов, но также может быть адаптирован для изучения удлиненных последовательностей, более точно воспроизводящих нативные структуры, встречающиеся в живых системах, что позволяет использовать дипольную ЭПР-спектроскопию с фотоиндуцированными метками в качестве перспективного инструмента для будущих исследований, направленных на анализ топологического многообразия G-квадруплексов и механизмов действия фотосенсибилизаторов на уровне структурной организации ДНК.

Построенная карта сайтов связывания перспективных для фотодинамической терапии лигандов с человеческим сывороточным альбумином представляет собой фундаментальную основу для рационального дизайна фотосенсибилизаторов с заданными фармакокинетическими свойствами. Выявленная зависимость относительной аффинности анионных соединений к сайтам гема и Садлоу I от молекулярной структуры лиганда открывает возможности для целенаправленной модификации периферических заместителей с целью оптимизации транспортных характеристик фотосенсибилизаторов. Обнаружение нетипичных областей связывания для нейтрального порфирина THPP вблизи сайта Садлоу II и сайта связывания жирных кислот FA6 расширяет понимание механизмов взаимодействия фотосенсибилизаторов с альбумином и может быть использовано для разработки препаратов с уникальными фармакокинетическими профилями. Связывание THPP вблизи области связывания гема указывает на потенциальную возможность конкуренции с эндогенными лигандами, что необходимо учитывать при клиническом применении. Впервые установленная локализация катионных порфиринов в нескольких позициях на поверхности альбумина имеет важное значение для понимания механизмов их транспорта в организме. Полученные данные о специфичности связывания различных типов порфиринов с ЧСА позволяют прогнозировать потенциальные лекарственные взаимодействия с препаратами, конкурирующими за те же сайты связывания. Это критически важно для безопасного клинического применения фотосенсибилизаторов, особенно у пациентов, получающих комплексную терапию.

Представленная стратегия с использованием КПМГ блоков (последовательность Карра–Парселла–Мейбума–Гилл) может быть применена в будущих импульсных ЭПР-экспериментах с фотовозбужденными триплетными метками и открывает перспективы для повышения чувствительности фотоиндуцированной дипольной ЭПР-спектроскопии в широком классе биомолекулярных систем. Выявленные фундаментальные закономерности влияния расщепления в нулевом магнитном поле и диполь-дипольных взаимодействий в спиновой паре на электронную спиновую декогеренцию обеспечивают научную основу для дальнейшего совершенствования методов фотоиндуцированной ЭПР-спектроскопии. Эти знания позволяют прогнозировать эффективность применения КПМГ последовательностей для различных типов спиновых систем и оптимизировать экспериментальные протоколы для конкретных задач.

Научные результаты, полученные соискателем, являются передовыми в данной области и стимулируют дальнейшее развитие научных направлений, связанных со структурными исследованиями методами ЭПР в области

химической физики и биологии с целью создания новых эффективных терапевтических препаратов.

### **Методология и методы исследования**

Основными экспериментальными методами в работе являются методы светоиндуцируемой дипольной ЭПР-спектроскопии (фотоиндуцированной магнитодипольной спектроскопии, ФИМД), а также метод ДЭЭР (двойной электрон-электронный резонанс) в комбинации с методом направленного введения спиновых меток. Все перечисленные ЭПР-методы позволяют изучать магнитные диполь-дипольные взаимодействия между спинами в нанометровом диапазоне расстояний. В результате обработки данных экспериментов определяется функция распределения по расстояниям между парамагнитными центрами. Анализ средних расстояний и ширины отдельных пиков, а также соотношения вкладов разных пиков позволяет получать структурную информацию, в том числе для сложных многокомпонентных систем.

Наряду с импульсными методиками был применен также метод стационарной ЭПР-спектроскопии, позволяющий получить информацию о подвижности метки. С помощью моделирования спектров стационарной ЭПР-спектроскопии возможно проводить количественное определение доли свободной фракции, а также связанной с биомолекулой. Метод времязарезенной ЭПР-спектроскопии – это прямой метод детектирования фотовозбужденных триплетных состояний молекул, позволяющий определять параметры распределения электронной спиновой плотности (параметры D и E) триплетного состояния.

Метод кругового дихроизма позволяет выявить возмущения структуры G-квадруплексов при введении спиновых меток. Для определения изменений кинетики связывания спин меченных производных ДНК с фотоактивными лигандами была применена оптическая спектроскопия.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Новый подход к исследованию структурной организации G-квадруплексов ДНК с фотосенсибилизаторами, основанный на комбинации методов импульсной дипольной и светоиндуцированной ЭПР-спектроскопии, применимость которого продемонстрирована на примере комплекса человеческой теломерной ДНК (HTel-22) с катионным порфирином TMPyP4 (мезо-тетра(N-метил-4-пиридин)порфирин).
2. Структурная модель комплекса HTel-22/TMPyP4, включающая установленную локализацию лиганда в специфических сайтах, доказательство сохранения конформационного равновесия при связывании и определение механизма фотоиндуцированных изменений, заключающегося в разворачивании и димеризации G-квадруплекса.
3. Новый подход к исследованию взаимодействия фотоактивных лигандов с белками на основе светоиндуцированной дипольной ЭПР-спектроскопии, позволяющий строить детальные карты сайтов связывания.

4. Сайты связывания тетрапиррольных лигандов различного зарядового состояния с альбумином, включающие, наряду с каноническими положениями (Садлоу I, гем-сайт), ранее неидентифицированные области, а также установленная зависимость локализации лиганда от особенностей его химического строения.

5. Методика применения блоков динамической связывки с интегрированием множественных эхо-сигналов в экспериментах дипольной ЭПР-спектроскопии с фотовозбужденными триплетными состояниями, обеспечивающая сокращение времени накопления сигнала без искажения результирующих распределений расстояний. Установленное влияние расщепления в нулевом магнитном поле и диполь-дипольного взаимодействия на электронную спиновую декогеренцию в условиях применения блоков динамической связывки, а также ограничения применимости предлагаемого метода, обусловленные флуктуациями мощности лазерного импульса.

### **Достоверность работы**

Достоверность представленных выводов и результатов в диссертационной работе обусловлена комплексным подходом к исследованиям с использованием современного экспериментального оборудования и теоретических расчетов. Дополнительным подтверждением достоверности служит многократная воспроизводимость полученных результатов и их согласие с современными теоретическими представлениями. Признание значимости основных выводов работы мировым научным сообществом основано на публикациях в рецензируемых зарубежных журналах, а также на высоких оценках на российских и международных конференциях.

### **Апробация работы**

Основные результаты работы были представлены и обсуждались на следующих школах и конференциях: «Magnetic resonance and magnetic phenomena in chemical and biological physics» (Санкт-Петербург, Россия, 2020), «MODERN DEVELOPMENT OF MAGNETIC RESONANCE 2020» (Казань, Россия, 2020), VIII Международная научно-практическая конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBIO» (Новосибирск, Россия, 2021), первая всероссийская школа для молодых ученых по медицинской химии «MEDCHEMSCHOOL2021» (Новосибирск, Россия, 2021), IX Международная конференция по физической химии краун-соединений, порфиринов и фталоцианинов (Туапсе, Россия, 2022), «10th International Voevodsky Conference» (Новосибирск, Россия, 2022).

### **Личный вклад соискателя**

Автор принимал участие в постановке задач, разработке плана исследований, обсуждении результатов, подготовке публикаций по теме диссертационной работы. Весь объем экспериментальных данных (приготовление образцов, непосредственно исследовательская часть

работы, математическая обработка полученных экспериментальных данных) получен лично автором.

Синтез диады триарилметильный радикал-фуллерен был осуществлен в лаборатории ион-радикальных реакций НИОХ СО РАН. Синтез спин-меченых олигонуклеотидов был осуществлен к.х.н. Чубаровым А. С. в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН. Расчеты, проведенные методом молекулярного докинга и молекулярной динамики, были осуществлены м.н.с. Колоколовым М. И. в лаборатории ЭПР-спектроскопии МТЦ СО РАН. DCPP, а также катионные пиридилизамещенные порфирины C3Ru и C5Ru были синтезированы в лаборатории РГУ МИРЭА к.х.н. Ждановой К. А и д.х.н. Брагиной Н. А.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора и трех глав, выводов, списка сокращений, благодарностей, списка цитируемой литературы, состоящего из 275 наименований. Работа изложена на 120 страницах машинописного текста, содержит 43 рисунка, 7 таблиц. Работа выполнялась в рамках научно-исследовательской работы в МТЦ СО РАН, а также была поддержана грантами РНФ №18-73-00292 и №20-73-10239.

### **Соответствие специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества**

Диссертационная работа соответствует следующим пунктам паспорта специальности 1.3.17 - химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества: п. 1 «Атомно-молекулярная структура химических частиц и веществ», п. 4 «спиновая динамика и спиновая химия; экспериментальные методы исследования химической, энергетической и спиновой динамики».

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** описываются актуальность и разработанность темы, формулируются цели и задачи исследования, описываются научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, методы исследования, формулируются положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов исследования, личный вклад автора, сведения об апробации результатов.

**Первая глава** посвящена литературному обзору. В *разделе 1.1* дается теоретическое описание методов фотоиндуцированной ЭПР-спектроскопии. В *подразделе 1.1.1* обсуждаются общее описание метода ЭПР-спектроскопии и его ключевые преимущества для изучения структуры биомолекулярных комплексов по сравнению с другими структурными методами. В *подразделе 1.1.2* приводится детальный обзор и анализ различных типов спиновых меток, используемых в дипольной ЭПР-спектроскопии. Особое внимание уделяется новому классу меток на основе фотовозбужденных триплетных состояний, подробно рассмотрен переход под действием света в триплетное состояние. Обсуждаются

факторы, которые могут влиять на квантовый выход триплетного состояния меток. В *подразделе 1.1.3.* приводятся основы формализма спинового гамильтониана для спиновых меток на основе фотовозбужденного триплетного состояния и обсуждаются их спектральные особенности. В *подразделе 1.1.4* описываются основы фотовозбужденной импульсной дипольной ЭПР-спектроскопии. В частности, приводится гамильтониан для пары спинов, связанных дипольным взаимодействием, описываются несколько ключевых методов с указанием особенностей каждого, а также способы анализа получаемых временных зависимостей. *Подраздел 1.2* посвящен ограничениям фотовозбужденной ЭПР-спектроскопии. В частности, рассматривается проблема ограничения частоты экспериментов, а также приводится потенциально эффективная стратегия решения через применение методик многократного рефокусирования эха. В *разделе 1.2* обсуждаются основы ФДТ, а также методы повышения ее эффективности. В *подразделе 1.2.1* дается описание основных процессов, происходящих во время ФДТ. В *подразделе 1.2.2* обсуждаются два перспективных направления в разработке противораковых терапий: использование G-квадруплексов ДНК как мишени для терапии и человеческого сывороточного альбумина как носителя для доставки препаратов. В *подразделе 1.2.3* представлен обзор перспективных фотосенсибилизаторов для ФДТ. Подчеркивается, что белки-переносчики (человеческий сывороточный альбумин) и мишени (G-квадруплексы ДНК) не являются пассивными, а активно изменяют фотофизические свойства ФС, что делает изучение таких комплексов критически важным.

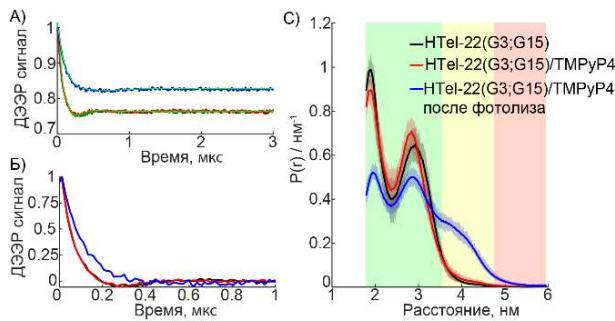
Во **второй главе** продемонстрирован новый подход к исследованию структурной организации G-квадруплексной ДНК и ее фотоиндуцированных перестроек на основе импульсной дипольной ЭПР-спектроскопии с фотовозбужденными триплетными состояниями в качестве спиновых меток.

Нитроксильная метка 3-иодметил-2,2,5,5-тетраметил-3-пирролин-1-оксил была присоединена к тиофосфатной модификации в олигонуклеотиде, которая замещена на определенной позиции остова. С помощью оптической спектроскопии и метода кругового дихроизма было показано, что спиновые метки, введенные в положения G3 и G15 HTel-22, не вызывают возмущения в структуре квадруплекса, а также не влияет на кинетику формирования комплекса TMPyP4/HTel-22.

На основе данных спектроскопии ДЭЭР для дважды меченной производной HTel-22 (G3;G15) были установлены конформации квадруплекса. Данные моделирования распределений по расстояниям указывают на то, что два пика в распределении G3-G15 соответствуют двум различным топологиям: первый пик со средним расстоянием 1.9 нм связан с антипараллельной структурой, тогда как второй пик на 2.8 нм соответствует параллельной конфигурации (**рисунок 1**). Также результаты

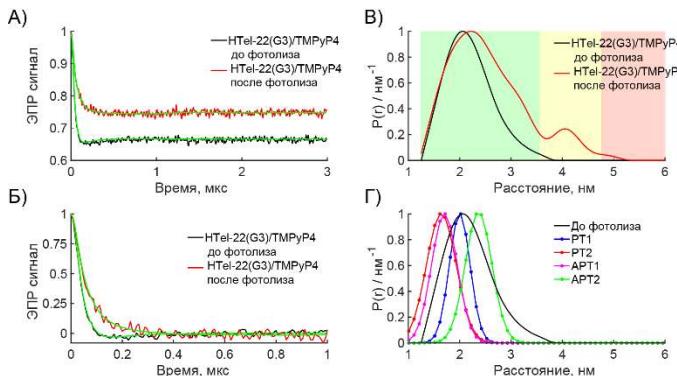
экспериментов дипольной ЭПР-спектроскопии однозначно указывают на то, что связывание HTel-22 с TMPyP4 не вызывает значительных конформационных переходов квадруплекса. После фотооблучения комплекса HTel-22 (G3;G15)/TMPyP4 уменьшается глубина модуляции. В распределении расстояний после фотолиза присутствуют расстояния в диапазоне 3.5–5 нм. Столь значительные структурные изменения свидетельствуют о разрушении квадруплексной укладки ДНК в результате фотолиза.

Результаты экспериментов РеФИМД (рефокусированной фотоиндуцированной магнитодипольной) спектроскопии позволили выявить позиции связывания порфирина TMPyP4 с G-квадруплексом. Полученные временные зависимости, а также соответствующие распределения расстояний представлены на **рисунке 2**. Было показано, что одним из участков связывания TMPyP4 является ранее только теоретически предсказанный участок APT2, расположенный на нижней тетраде антипараллельной формы (**рисунок 3**) [6]. Кроме того, данные дипольной ЭПР-спектроскопии демонстрируют две ключевые структурные перестройки в результате фотооблучения: разворачивание исходной G-квадруплексной структуры и увеличение доли димерных форм. Количественный анализ показал, что фотооблучение в течение одного часа приводит к увеличению доли димеров с  $16 \pm 5\%$  до  $36 \pm 5\%$ .

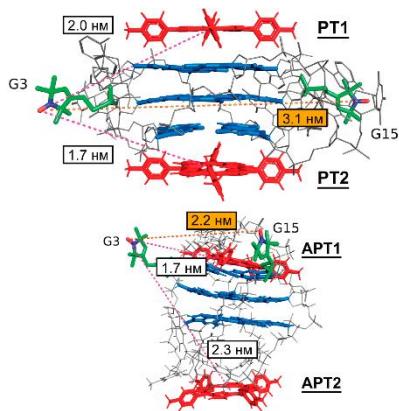


**Рисунок 1.**  
Эксперименты ДЭЭР  
для дважды  
меченного комплекса  
TMPyP4 с HTel-22  
(G3; G15) при 50 К  
без TMPyP4 (черные  
линии) и с TMPyP4 до  
(красные линии)  
и после фотолиза в  
течение 60 минут  
(синие линии). А)

Временные зависимости после вычета базовой линии и результаты их моделирования (зеленые линии) Б) Временные зависимости, нормированные на глубину модуляции С) Нормированные на глубину модуляции рассчитанные профили распределения расстояний с указанием границ погрешностей. Различными цветами на распределениях указаны диапазоны достоверности: зеленая область-достоверна форма распределения, желтая- достоверно среднее значение и ширина распределения, красная-только среднее значение.



**Рисунок 2.** Эксперименты РейФИМД спектроскопии для комплекса TMPrP4 с HTel-22(G3) до (черные линии) и после (красные линии) фотолиза. А) Временные зависимости после вычета базовой линии и результаты их моделирования (зеленые линии). Б) Временные зависимости, нормированные на глубину модуляции, и их наилучшие аппроксимирующие кривые, полученные с использованием регуляризации Тихонова. В) Нормированные на максимум интенсивности рассчитанные профили распределения расстояний. Г) Распределение расстояний до фотолиза (черная линия) и гауссовые аппроксимации рассчитанных из моделирования методом молекулярной динамики гистограмм, соответствующие различным позициям TMPrP4 в комплексе.

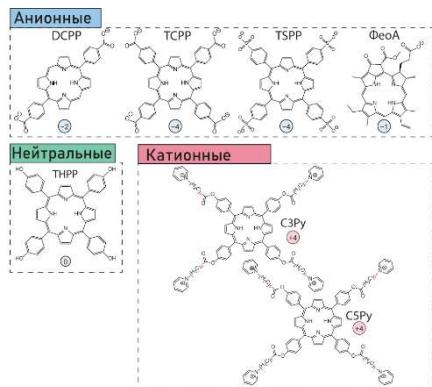


**Рисунок 3.** Топологии комплекса HTel-22/TMPrP4: параллельная (сверху), антипараллельная (снизу). На рисунке также указаны средние расстояния между нитроксильной меткой, введенной в положение G3, и TMPrP4, а также расстояния между нитроксильными метками, введенными в положения G3 и G15 (выделены оранжевым цветом). Порфирины (выделены красным) локализованы в позициях PT1 и PT2 для параллельной конфигурации, и в APT1 и APT2 для антипараллельной конфигурации. Тетрады гуанинов выделены синим цветом для наглядности.

Важно отметить, что предложенный подход применим не только к коротким моделям G-квадруплексов, но также может быть адаптирован для изучения удлиненных последовательностей, более точно воспроизводящих нативные структуры, встречающиеся в живых системах. Таким образом, дипольная ЭПР-спектроскопия с фотоиндуцированными

метками представляет собой перспективный инструмент для будущих исследований, направленных на анализ топологической пластичности G-квадруплексов и механизмов действия фотосенсибилизаторов на уровне структурной организации ДНК.

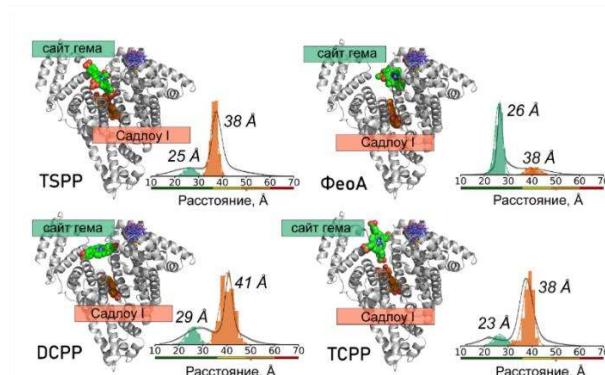
В третьей главе продемонстрирован потенциал дипольной ЭПР-спектроскопии как высокоинформационного метода для построения детальной карты сайтов связывания фотоактивных лигандов различной природы с человеческим сывороточным альбумином. На основе полученных данных впервые была построена экспериментально подтвержденная карта сайтов связывания фотоактивных лигандов, структуры которых представлены на **рисунке 4**, с ЧСА.



Для всех исследованных анионных соединений (включая FeoA, TSPP, DCPP и TCPP) показано участие как гем-сайта, так и сайта Садлоу I в связывании, однако их относительная аффинность к этим участкам существенно зависит от молекулярной структуры лиганда. Структуры исследованных комплексов ЧСА/анионные ФС представлены на **рисунке 5**. Так, для малого по размеру лиганда FeoA доминирующим участком связывания является гем-сайт. Благодаря компактной структуре и электростатическим взаимодействиям, FeoA может

Рисунок 4. Химические структуры исследуемых фотосенсибилизаторов с указанием общего молекулярного заряда при pH 7.0 (обозначен в кружках).

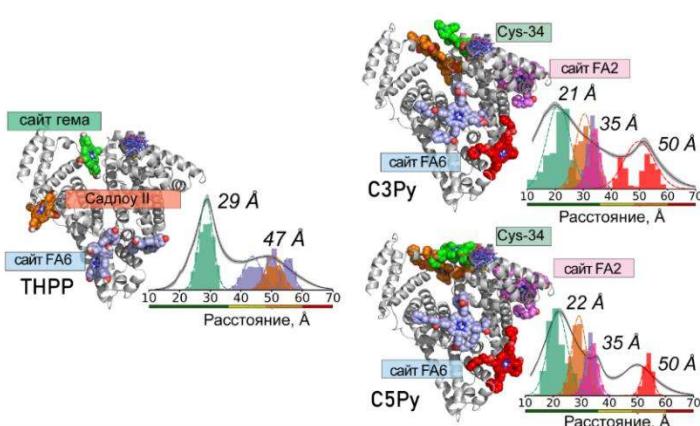
полностью входить в соответствующий карман, формируя высокоаффинный комплекс. Взаимодействие с участком Садлоу I при этом гораздо слабее. В отличие от FeoA, более громоздкие анионные порфирины с периферическими заместителями (TSPP, DCPP и TCPP) не могут полностью поместиться в ограниченное пространство гем-сайта. Их основным участком связывания становится более объемный и структурно гибкий сайт Садлоу I, адаптированный к взаимодействию с крупными лигандами. Таким образом, геометрия и размер лиганда являются определяющими факторами при выборе предпочтительного сайта связывания на альбумине.



**Рисунок 5.** Структуры исследованных комплексов ЧСА/анионные ФС. Для каждого соединения слева показаны предсказанные структуры комплексов альбумин-фотосенсибилизатор, а также позы докинга, демонстрирующие лучшую корреляцию с экспериментальными данными. Справа представлены экспериментальные распределения расстояний между нитроксильной меткой и ФС (черная линия), расчетные распределения расстояний для предсказанных сайтов связывания представлены цветными гистограммами, аппроксимированные гауссовой функцией с соответствующим цветом. Возможные конформации нитроксильной метки, присоединенной к Cys34, отображены синим цветом. Цветные полосы внизу каждого распределения расстояний обозначают диапазоны достоверности.

Структуры исследованных нейтральных и катионных ФС в комплексе с ЧСА представлены на [рисунке 6](#). Так, основной сайт связывания нейтрального порфирина THPP с альбумином локализован вблизи гем-сайта. Дополнительно для THPP были выявлены потенциальные нетипичные участки связывания: вблизи сайта Садлу II и в области, прилегающей к участку связывания жирных кислот FA6. Кроме того, впервые было показано, что катионные порфирины связываются на поверхности альбумина, занимая несколько участков. Независимо от длины периферических групп, их доминирующий сайт расположен в субдомене IB, вблизи остатка Cys34.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что связывание фотосенсибилизаторов с альбумином происходит по нескольким положениям и не всегда ограничивается классическими сайтами. Это необходимо учитывать при интерпретации флуоресцентных данных, в частности при анализе тушения триптофана Trp214, широко используемого в оценке локализации лигандов [7].



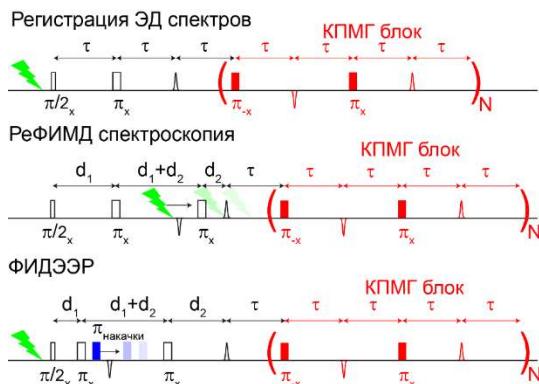
**Рисунок 6.** Структуры исследованных комплексов ЧСА/нейтральные или кационные ФС. Для каждого соединения слева показаны предсказанные структуры комплекса альбумин/ФС, а также позы докинга, демонстрирующие лучшую корреляцию с экспериментальными данными. Справа представлены экспериментальные распределения расстояний между нитроксильной меткой и ФС (черная линия), расчетные распределения расстояний для предсказанных сайтов связывания представлены цветными гистограммами, аппроксимированные гауссовой функцией с соответствующим цветом. Возможные конформации нитроксильной метки, присоединенной к Cys34, отображены синим цветом.

Полученные результаты подчеркивают необходимость осторожного подхода к трактовке флуоресцентных измерений и демонстрируют важность привлечения дополнительных методов, таких как дипольная ЭПР-спектроскопия, для точного картирования сайтов связывания фотосенсибилизаторов на альбумине.

В четвертой главе представлены результаты исследования эффективности и ограничений подхода к сокращению времени накопления сигнала, основанного на применении многократного детектирования сигнала спинового эха с использованием последовательностей динамической развязки (в частности, последовательности типа Карра–Парселья–Мейбума–Гилл, КПМГ) при его применении в экспериментах дипольной ЭПР-спектроскопии с фотовозбужденными триплетными состояниями. До настоящего времени импульсные последовательности с многократным рефокусированием первичного эха не получили широкого распространения в ЭПР-спектроскопии, отчасти из-за технических сложностей их реализации на коммерческих спектрометрах. Кроме того, возможность быстрого накопления сигнала (высокие скорости повторения импульсных последовательностей) для большинства изучаемых систем в некоторой степени снизила привлекательность данного подхода. Однако в

условиях, когда скорость накопления сигнала ограничена — как, например, при работе с фотовозбужденными триплетными состояниями, — данный метод может быть особенно эффективен.

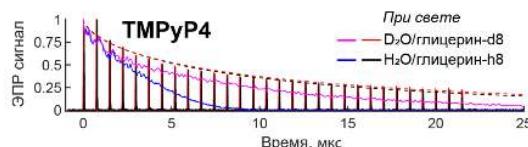
Было проведено сравнение эффективности применения блоков КПМГ для различных объектов исследования: фотовозбужденное триплетное состояние порфирина TMPyP4, а также диада фуллерен - стабильный триарилметильный радикал ( $C_{60}$ ТАМ). Регистрации временных зависимостей спада рефокусированных эх проводились с использованием последовательностей, представленной на **рисунке 7**, для различных экспериментов: регистрация эхо-детектируемых (ЭД) спектров, а также эксперименты РеФИМД спектроскопии и ФИДЭЭР (фотоиндуцированный двойной электрон-электронный резонанс).



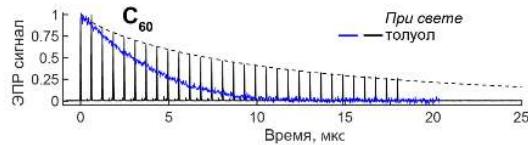
**Рисунок 7.** Импульсные последовательности экспериментов ЭПР-спектроскопии с использованием КПМГ-блоков.

На **рисунке 8** представлены временные зависимости, полученные при применении КПМГ блока с оптимальными задержками между импульсами. Полученные временные зависимости содержат первое ("первичное") эхо и серию последующих рефокусированных эх, формируемых КПМГ последовательностью. Стимулированное эхо, образованное первыми тремя импульсами, перекрывается со вторым эхом, усиливая его. Аналогичные вклады от различных стимулированных эх наблюдаются и для всех последующих сигналов, однако из-за доминирующего эффекта электронной декогеренции происходит спад интенсивности сигналов рефокусированных эх относительно первичного. Огибающие рефокусированных эх, а также  $T_m$ -зависимости аппроксимировались функцией  $I(t) = A \exp(-(t/T)^p)$ , где  $T$  соответствует  $T_{\text{КПМГ}}$  при аппроксимации огибающей во временной зависимости, и  $T$  соответствует  $T_m$  (время фазовой памяти) при аппроксимации  $T_m$  - зависимостей.

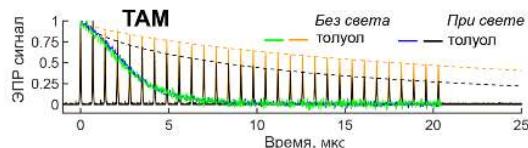
A)



Б)



В)



для ТАМ в диаде  $C_60$ ТАМ в присутствии и отсутствии лазерных импульсов. Приведены также соответствующие аппроксимации огибающих амплитуд сигналов эх (цветовой код пунктирных линий аналогичен цветовому коду временных зависимостей сигналов).  $T_m$ -зависимости представлены линиями со следующим цветовым кодом: TMPyP4 в  $D_2O$ / глицерол -d8 (А, пурпурная), TMPyP4 в  $H_2O$ / глицерол-h8(А, синяя),  $C_60$  (Б, синяя), ТАМ (В; при свете – синяя, без света – зеленая).

**Таблица 1.** Значения времен  $T_m$  (время фазовой релаксации),  $T_{\text{КПМГ}}$  и показателя  $p$  для исследуемых спиновых меток в присутствии и отсутствии фотовозбуждения  $C_60$  или TMPyP4. Погрешность определения параметров  $p$ ,  $T_m$ ,  $T_{\text{КПМГ}}$  не превышает 5%.

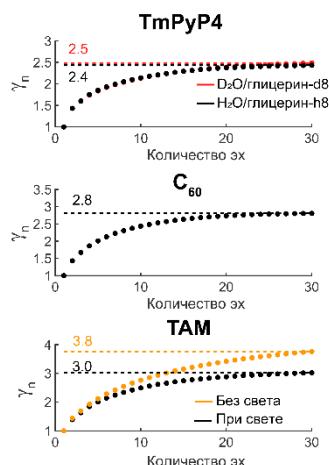
Спиновая система	Растворитель	Свет	$T_m$ , мкс / $p$	$T_{\text{КПМГ}}$ , мкс / $p$
$C_60$	толуол	Вкл.	4.1 / 1.3	11.3 / 0.8
ТАМ	толуол	Выкл.	3.2 / 1.6	29.4 / 0.8
ТАМ	толуол	Вкл.	3.2 / 1.6	13.4 / 0.7
TMPyP4	$H_2O$ /глицерол-h8	Вкл.	3.8 / 1.4	9.5 / 0.6
TMPyP4	$D_2O$ /глицерол-d8	Вкл.	8.4 / 1.0	10.0 / 0.6

## Рисунок

8.

Нормированные модули временных зависимостей, зарегистрированных при фотовозбуждении триплетных состояний TMPyP4 и  $C_60$ ТАМ с использованием блока КПМГ. А) Эффективность применения КПМГ блока для TMPyP4 в различных растворителях.

Б) Эффективность применения КПМГ блока для  $C_60$ . В) Эффективность применения КПМГ блока для ТАМ



**Рисунок 9.** Выигрыш в отношении сигнал/шум (ОСШ)  $\gamma_n$  в зависимости от числа просуммированных эх. Все данные нормированы на ОСШ при  $n=1$ .

последовательности, поэтому не удалось экспериментально максимизировать выигрыш ОСШ для ТАМ. Однако из-за диполь-дипольного взаимодействия с фотовозбужденным триплетным состоянием  $C_60$  внутри диады, выигрыш ОСШ для ТАМ снижается до 3.

Можно ожидать аналогичный или даже больший выигрыш при использовании фотоиндуцируемых меток с более слабой интенсивностью сигнала — например, порфириновых производных, так как  $C_60$  и ТАМ дают одни из наиболее интенсивных сигналов среди фотоиндуцируемых и стабильных спиновых меток соответственно. Амфи菲尔ные мезо-арилзамещенные порфирины и их комплексы с металлами представляют значительный интерес с точки зрения их применения одновременно в качестве ФС и спиновых меток для дипольной ЭПР-спектроскопии. Регистрируемый сигнал таких порфиринов существенно ниже, чем для модельного ТМРуP4. Однако введение терминальных пиридиниевых группировок на коротких алкильных спейсерах может значительно повлиять на параметры РНП, и подход с применением КПМГ блоков может оказаться неэффективным. Было проведено исследование ряда катионных мезо-арилзамещенные порфирины и их металлокомплексов с Zn. Показано, что введение пиридиниевых заместителей через алкильные спейсеры не приводит к значительным изменениям параметров РНП порфиринов, следовательно, не влияет на конфигурацию их триплетного состояния.

Общий выигрыш в отношении сигнала к шуму (ОСШ) для КПМГ<sub>n</sub> ( $\gamma_n$ ) можно определить как  $\gamma_n = \frac{1}{\sqrt{n}} \frac{I_n}{I_1}$ , где  $I_1$  - интегральная интенсивность первого эха,  $I_n$  - сумма интегральных интенсивностей  $n$  эх. На **рисунке 9** представлена зависимость выигрыша ОСШ от числа интегрируемых эх.

Полученные зависимости демонстрируют заметное увеличение ОСШ с ростом  $n$  как для фотовозбужденного триплетного состояния ТМРуP4, так и для  $C_60$ :  $\gamma_n$  достигает значений 2.5–2.8 и выходит на плато около 30-го импульса. Для ТАМ было получено усиление ОСШ 3.8, но это значение не является максимальным. Технические ограничения используемого спектрометра позволяют применять не более 30 импульсов в

Введение цинка в макроцикл порфиринов вызывает изменение спектральной картины и смену типа поляризации, что связано с изменением заселенности подуровней триплетного состояния при введении металлов. Появление спин-орбитального взаимодействия с ионом цинка приводит к смешиванию d-орбиталей цинка с π-системой порфирина, вследствие чего подуровень  $T_z$  триплетного состояния преимущественно заселяется при возбуждении лазерным импульсом. Как и в случае порфиринов без металлов, введение пиридиниевых заместителей через алкильные спейсеры не оказывает существенного влияния на электронную структуру триплетного состояния комплекса порфирина с цинком.

Представлены результаты применения блоков КПМГ к регистрации эхо-детектируемых спектров с фотовозбуждением. Так, было получено увеличение ОСШ (отношение сигнала к шуму) в 2.6 раза при применении блоков динамической связки. Показано, что применение блоков КПМГ не приводит к искажению распределений расстояний, получаемых в методах ФИДЭЭР и РеФИМД. Однако глубина модуляции уменьшается с ростом  $n$ : для ФИДЭЭР она уменьшается с 64% до 55%, а для РеФИМД спектроскопии - с 29% до 22% из-за увеличения вклада интеграла стимулированных эх, накладывающихся на положения рефокусированных. Для учета этих изменений были рассчитаны скорректированные значения выигрыша ОСШ  $\beta_n = \frac{1}{\sqrt{n}} \frac{\lambda_n}{\lambda_1}$  с учетом абсолютных значений глубины модуляции  $\lambda_n$  при суммировании  $n$  эх. Даже после введения этой поправки ожидалось 2.3-кратное увеличение ОСШ для обоих методов. Однако экспериментально определенные значения ОСШ, рассчитанные по реальному уровню шума во временных зависимостях, существенно отличались от ожидаемых. Такое существенное расхождение между расчетным и экспериментальным выигрышем ОСШ указывает на наличие дополнительных источников шума, не учтенных в текущей модели.

Важный аспект экспериментов светоиндуцированной дипольной ЭПР-спектроскопии заключается в том, что для записи каждой точки во временной зависимости во время накопления требуется новый лазерный импульс. Это означает, что временные зависимости могут содержать больше шума из-за флуктуаций мощности лазерных импульсов. В частности, изменение мощности лазера в ФИДЭЭР в основном вызывает флуктуации регистрируемого фотоиндуцированного сигнала, то есть интенсивности спинового эха  $I_n$ . Определить доминирующий механизм лазерно-индуцированного шума в РеФИМД спектроскопии сложнее, поскольку мощность лазерных импульсов в этом методе влияет на глубину модуляции и сигнал различными способами. Помимо прямой зависимости глубины модуляции от мощности импульсов, флуктуации мощности также могут изменять интенсивность наблюдаемого сигнала за счет локального нагрева. Более того, интенсивность эха ТАМ может падать вследствие

возбуждения спина-партнера  $C_{60}$  в диаде  $C_{60}\text{ТАМ}$ . Поскольку глубина модуляции в РеФИМД спектроскопии относительно мала ( $\sim 30\%$ ), в первом приближении можно предположить, что флуктуации интенсивности лазерных импульсов вызывают флуктуации значения общего интеграла  $n$  эх ( $I_n$ ).

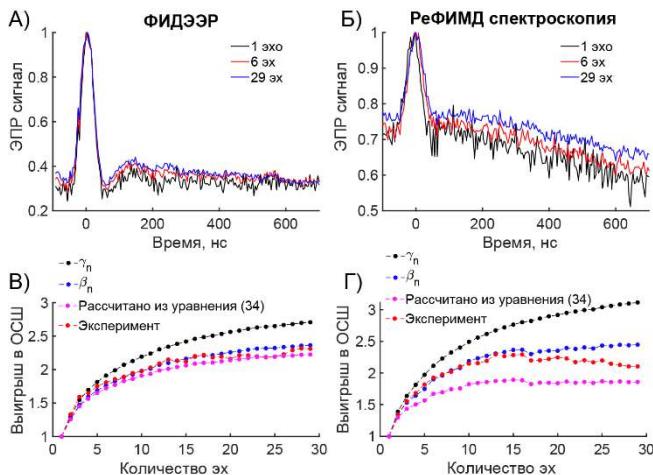
За один лазерный импульс может быть зарегистрировано несколько эх, следовательно, шум спектрометра может усредняться значительно быстрее, чем шум мощности лазерных импульсов. Предполагая, что собственные шумы спектрометра и флуктуации лазерных импульсов являются независимыми параметрами в экспериментах, было получено выражение (34) для ожидаемого выигрыша в ОСШ с учетом флуктуаций мощности лазерного импульса:

$$\frac{\text{ОСШ}(n)}{\text{ОСШ}(1)} = \frac{\beta_n}{\gamma_n} \sqrt{\frac{(\varepsilon_{\text{лазер}})^2 + (\varepsilon_{\text{спек},1})^2}{(\varepsilon_{\text{лазер}})^2 + \left(\frac{\varepsilon_{\text{спек},1}}{\gamma_n}\right)^2}},$$

где  $\varepsilon_{\text{лазер}}$  и  $\varepsilon_{\text{спек},1}$  — это относительное стандартное отклонение мощности лазерного импульса и относительный шум спектрометра соответственно.

С помощью полученного выражения было показано, что для систем с интенсивным ЭПР-сигналом даже 2%-ные флуктуации энергии лазерных импульсов действительно существенно снижают чувствительность. Напротив, в системах с более слабым сигналом влияние этих флуктуаций оказывается значительно меньшим.

Условие малости  $\varepsilon_{\text{лазер}}$  может быть выполнено либо при меньшем значении флуктуации мощности лазерных импульсов, либо при более высоком относительном шуме спектрометра. Чтобы смоделировать такие условия, в экспериментах ФИДЭР и РеФИМД спектроскопии концентрация спиновой системы  $C_{60}\text{ТАМ}$  была уменьшена с 120 мкМ до 24 мкМ. В результате интенсивность регистрируемых эх стала ниже, что привело к более высоким значениям  $\varepsilon_{\text{спек},1}$ . Кроме того, удалось уменьшить флуктуации мощности лазерных импульсов в ФИДЭР за счет продолжительной (3 дня) работы лазера перед экспериментом. Временные зависимости, полученные при этих условиях, представлены на **рисунке 10**.



**Рисунок 10.** Эксперименты ФИДЭР и РеФИМД спектроскопии с применением блоков КПМГ<sub>n</sub> (n=1-29) для С<sub>60</sub>ТАМ в толуоле с концентрацией 24 мкМ. А, Б) Временные зависимости для различного числа интегрированных эх: n=1 (черная линия), 6 (красная линия) и 29 (синяя линия). В, Г) Соответствующие зависимости выигрыша ОСШ от n: ожидаемые значения  $\gamma_n$ , рассчитанные по уравнению (29) (черная линия); скорректированные значения  $\beta_n$  (синяя линия); экспериментально рассчитанный выигрыш ОСШ (красная линия); и выигрыш ОСШ, предсказанный из уравнения (34) (розовая линия).

В этом случае уровень шума спектрометра становится доминирующим фактором, и флуктуации мощности лазера практически не влияют на результат. Достигается ~2.4-кратное увеличение чувствительности как в ФИДЭР, так и в РеФИМД, что позволяет сократить общее время накопления примерно в шесть раз.

Так как С<sub>60</sub> и ТАМ дают одни из наиболее интенсивных сигналов среди фотоиндуцируемых и стабильных спиновых меток соответственно, можно ожидать аналогичный или даже больший выигрыш при использовании фотоиндуцируемых меток с более слабой интенсивностью сигнала — например, порфириновых производных. Таким образом, предложенный подход особенно эффективен для образцов с низкой концентрацией и слабых сигналов, то есть в тех случаях, где повышение чувствительности наиболее востребовано.

Представленная методика может быть использована в будущих импульсных ЭПР-экспериментах с фотовозбужденными триплетными метками и открывает перспективы для повышения эффективности фотоиндуцированной ЭПР-спектроскопии в широком классе биомолекулярных систем.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Показано, что комбинация методов импульсной дипольной и светоиндуцированной ЭПР-спектроскопии позволяет получить детальную информацию о структурных особенностях комплексов G-квадруплексов ДНК с фотосенсибилизаторами и отслеживать структурные изменения в этих комплексах под действием света. С помощью предложенного подхода исследован комплекс человеческой теломерной ДНК (HTel-22) с катионным порфирином TMPyP4 (мезо-тетра(N-метил-4-пиридил) порфирина).
2. Установлено, что G-квадруплекс HTel-22 при связывании с порфирином не изменяет конформации и существует в равновесии параллельной и антипараллельной топологий. При этом порфирин TMPyP4 локализуется на G-квадруплексе в нескольких позициях, включая ранее предсказанную позицию APT2 на нижней тетраде антипараллельной структуры. Фотооблучение комплекса HTel-22/TMPyP4 приводит к двум основным структурным изменениям: разворачиванию исходной G-квадруплексной структуры и формированию димерных форм.
3. Продемонстрировано, что светоиндуцированная дипольная ЭПР-спектроскопия позволяет одновременно регистрировать все сайты связывания фотоактивных лигандов с белком и оценивать их относительные заселенности. Тетрапиррольные фотосенсибилизаторы различного зарядового состояния обладают множеством сайтов связывания с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), включая как традиционные участки (Садлоу I и гем-сайт), так и нетипичные области, не выявленные ранее другими методами.
4. Установлено, что анионные фотосенсибилизаторы связываются с ЧСА одновременно в гем-сайте и сайте Садлоу I, при этом их сродство к указанным участкам зависит от структуры и размера лиганда. Нейтральный фотосенсибилизатор также образует комплексы с ЧСА в нескольких положениях, доминирующим среди которых является сайт вблизи гема, наряду с дополнительными сайтами на поверхности белка. Катионные порфирины локализуются исключительно на поверхности альбумина, занимая несколько различных участков.
5. Показано, что применение блоков динамическойвязки с интегрированием множественных эхо-сигналов в экспериментах дипольной ЭПР-спектроскопии с фотовозбужденными триплетными состояниями позволяет сократить время накопления сигнала без искажения результирующих распределений расстояний. При этом расщепление в нулевом магнитном поле триплетных состояний и диполь-дипольное взаимодействие спиновой пары вносят вклад в электронную спиновую декогеренцию при использовании блоков динамическойвязки. Эффективность предложенного подхода критически зависит от стабильности мощности лазерного импульса, причем негативное влияние

флуктуаций мощности лазера наиболее выражено в системах с интенсивным фотоиндуцированным ЭПР-сигналом.

#### **Публикации автора по теме диссертации**

1. N. E. Sannikova, M. I. Kolokolov, T. A. Khlynova, A. S. Chubarov, Y. F. Polienko, M. V. Fedin, O. A. Krumkacheva, Revealing light-induced structural shifts in G-quadruplex-porphyrin complexes: a pulsed dipolar EPR study //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2023. – Vol. 25. – № 33. – P. 22455-22466.
2. M. I. Kolokolov, N.E. Sannikova, S. A. Dementev, R.A. Podarov, K. A. Zhdanova, N.A. Bragina, A. S. Chubarov, M.V. Fedin, O.A. Krumkacheva, Enhanced Binding Site Identification in Protein–Ligand Complexes with a Combined Blind Docking and Dipolar Electron Paramagnetic Resonance Approach //Journal of the American Chemical Society. – 2025.- Vol. 147. – № 16. – P. 13677–13687.
3. N. E. Sannikova, K. A. Zhdanova, A. S. Spitsyna, N. A. Bragina, M. V. Fedin, O. A. Krumkacheva, Study of Cationic Porphyrins and Their Metal Complexes by ESR Techniques //Russian Journal of Coordination Chemistry. – 2022. – Vol. 48. – № 1. – P. 1-8.
4. N. E. Sannikova, A. R. Melnikov, S. L. Veber, O. A. Krumkacheva, M. V. Fedin, Sensitivity optimization in pulse EPR experiments with photo-labels by multiple-echo-integrated dynamical decoupling //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2023. – Vol. 25. – №17. – P. 11971-11980.

#### **Тезисы докладов автора по теме диссертации**

1. Sannikova N.E., Timofeev I., Bagryanskaya E., Bowman M., Fedin M., Krumkacheva O., Electron Spin Relaxation of Photoexcited Porphyrin in Water-Glycerol Glass // Modern development of magnetic resonance 2020, 28 September-02 October 2020 (Kazan, Russia)
2. Саникова Н.Э., Тимофеев И.О., Чубаров А.С., Лебедева Н.Ш., Семейкин А.С., Кириллок И.А., Центалович Ю.П., Боуман М.К., Федин М.В., Багрянская Е.Г., Крумкачева О.А Исследование Комплексов Фотосенсибилизаторов С Альбумином Методами ЭПР-спектроскопии// OpenBIO VIII Международная научно-практическая конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов 2021, 5-8 сентября 2021 (Новосибирск, Россия)
3. Саникова Н.Э., Жданова К.А., Спицына А.С., Чубаров А.С., Брагина Н.А., Федин М.В., Крумкачева О.А. Исследование Методами ЭПР спектроскопии Комплексов Фотосенсибилизаторов с Альбумином, Перспективных в Фотодинамической Терапии Рака // Первая всероссийская школа для молодых ученых по медицинской химии MEDCHEMSCHOOL2021, 4-9 November 2021 (Новосибирск, Россия)
4. Саникова Н.Э., Хлынова Т.А., Жданова К.А., Брагина Н.А., Федин М.В., Крумкачева О.А Исследование комплексов катионных порфиринов с G-квадруплексами ДНК методами ЭПР и оптической спектроскопии// IX

Международная конференция по физической химии краун-соединений, порфиринов и фтaloцианинов, 13-19 сентября 2022 (*Tyance, Россия*)

## Литература

1. Albertini, M. Porphyrin Triplet State as a Potential Spin Label for Nanometer Distance Measurements by PELDOR Spectroscopy / M. Albertini, D. Carbonera, M. Gobbo [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2014. – Vol. 136, № 18. – P. 6582–6585.
2. Krumkacheva, O. A. Triplet Fullerenes as Prospective Spin Labels for Nanoscale Distance Measurements by Pulsed Dipolar EPR Spectroscopy / O. A. Krumkacheva, I. O. Timofeev, L. V. Politanskaya [et al.] // Angewandte Chemie - International Edition. – 2019. – Vol. 58, № 38. – P. 13271–13275.
3. Fasano, M. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin / M. Fasano, S. Curry, E. Terreno [et al.] // IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life). – 2005. – Vol. 57, № 12. – P. 787–796.
4. Balasubramanian, S. Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? / S. Balasubramanian, L. H. Hurley, S. Neidle // Nature Reviews Drug Discovery. – 2011. – Vol. 10, № 4. – P. 261–275.
5. Sannikova, N. E. Application of EPR to porphyrin-protein agents for photodynamic therapy / N. E. Sannikova, I. O. Timofeev, A. S. Chubarov [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2020. – Vol. 211. – P. 112008.
6. Ali, A. Ligand 5,10,15,20-Tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphine (TMPyP4) Prefers the Parallel Propeller-Type Human Telomeric G-Quadruplex DNA over Its Other Polymorphs / A. Ali, M. Bansal, S. Bhattacharya // The Journal of Physical Chemistry B. – 2015. – Vol. 119, № 1. – P. 5–14.
7. Povinelli, A. P. R. A flaw in applying the FRET technique to evaluate the distance between ligands and tryptophan residues in human serum albumin: Proposal of correction / A. P. R. Povinelli, L. de Carvalho Bertozo, G. Zazeri [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2023. – Vol. 242. – P. 112693.