

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук
Санниковой Натальи Эдуардовны
на тему: «РАЗВИТИЕ МЕТОДОВ ИМПУЛЬСНОЙ ЭПР-
СПЕКТРОСКОПИИ С ФОТОВОЗБУЖДЕНИЕМ ДЛЯ
ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ БИМОЛЕКУЛ С
ФОТОАКТИВНЫМИ ЛИГАНДАМИ»
по специальности 1.3.17. Химическая физика, горение и взрыв,
физика экстремальных состояний вещества

Научно-квалификационная работа Санниковой Н.Э. посвящена разработке экспериментальных подходов к изучению структуры комплексов биомолекул с фотоактивными лигандами, имеющими высокие перспективы практического применения в качестве сенсibilизаторов для фотодинамической терапии онкологических заболеваний. Исследования последних лет показали большие преимущества использования данного терапевтического подхода, как в качестве самостоятельного способа лечения рака, так и в сочетании с традиционными химиотерапией и радиотерапией. В настоящее время значительные усилия научного сообщества направлены на точное определение центров связывания фотосенсibilизаторов (ФС) с ДНК, в частности, с G-квадруплексами (G4), и человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) - основным переносчиком низкомолекулярных веществ в организме, а также на выяснение степени влияния фотовозбуждения лиганда на структуру биомолекул. Высокая топологическая изменчивость G-квадруплексов и наличие множества возможных центров связывания ФС с биомолекулами ограничивают возможности традиционных методов (ЯМР, рентгеноструктурный анализ) для получения структурной информации. По этой причине автор диссертации остановила свой выбор на импульсной спектроскопии ЭПР, которая давно и успешно применяется для изучения структуры белков, содержащих спиновые метки, введенные в выбранные сайты молекул. Диполь-дипольное взаимодействие между метками, как правило, нитроксильными фрагментами, позволяет устанавливать расстояния между сайтами связывания в интервале от 1.5 до 8 нм. Однако при наличии в

качестве лиганда ФС, способного под действием света переходить в триплетное возбужденное состояние, открывается возможность измерения расстояния между центром связывания ФС и заранее введенной стабильной спиновой меткой. При этом гиперполяризация фотовозбужденных триплетных уровней значительно повышает интенсивность сигнала и увеличивает точность метода. Результаты, представленные в диссертации, убедительно свидетельствуют о высокой перспективности применения разработанных автором подходов к изучению структуры комплексов ФС с биомолекулами. Действительно, предложенные методы и подходы позволяют надежно анализировать большое многообразие структур G4 и ЧСА, включая множественные сайты связывания ФС, то есть, изучать природные системы «как они есть». Учитывая растущие запросы современной биомедицинской химии на получение надежной структурной информации о биологических молекулах, тематика исследования и полученные результаты, безусловно, являются **актуальными**.

Научно-квалификационная работа Санниковой Н.Э. является завершенным исследованием, изложенным на 120 страницах машинописного текста, иллюстрированного 43 рисунками и 7 таблицами. Список цитируемой литературы содержит 275 наименований. Работа состоит из введения, обзора литературы, и трех глав, каждая из которых включает краткое введение, экспериментальную часть, а также результаты экспериментов и их обсуждение. В конце работы приведены основные результаты и выводы диссертационного исследования, список сокращений и список цитируемой литературы.

Во введении представлены актуальность темы научно-квалификационной работы и степень ее разработанности, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Здесь же сформулирована цель работы и задачи для её достижения, описаны основные методы и методология исследования. Сформулированы положения, выносимые на защиту, обозначен личный вклад автора, приведены опубликованные статьи по теме диссертации и конференции, на которых происходила апробация работы, описана степень достоверности полученных результатов.

Литературный обзор (глава 1) включает несколько разделов. *Первый раздел* посвящен рассмотрению физики процесса формирования

фотовозбужденного триплетного состояния, а также методам ЭПР спектроскопии, используемым для анализа таких систем. Подробно рассмотрены расщепление в нулевом поле, симметрия диполь-дипольных взаимодействий неспаренных электронов триплетного состояния, угловая зависимость диполь-дипольного взаимодействия. Указано, что необходимым условием проведения импульсных дипольных экспериментов ЭПР спектроскопии является иммобилизация спин-меченых биомолекул, поскольку их вращение приводит к усреднению диполь-дипольных взаимодействий до нуля. Проанализирована форма сигналов в экспериментах ДЭЭР. Показано, что использование фотовозбужденного триплетного состояния в качестве спина для наблюдения способно повысить отношение сигнал/шум регистрируемых временных зависимостей благодаря гиперполяризации триплетных уровней. Указано, что использование фотовозбуждения сопряжено с рядом трудностей. Так, частота лазерных систем ограничивает частоту импульсной последовательности, а так как триплетные системы характеризуются длительными временами жизни, возникает также ограничение частоты повторения. Однако перечисленные недостатки могут быть компенсированы высокой спиновой поляризацией (высокой интенсивностью сигнала).

Второй раздел литературного обзора посвящен фотодинамической терапии рака. Приведен механизм действия ФС на раковые ткани. Описана структура и основные свойства G4, показана высокая перспективность создания комплексов G4 с ФС. Отмечен природный полиморфизм квадруплексов и актуальность изучения их структурных перестроек, вызванных присоединением ФС-лигандов и их фотовозбуждением. Большое внимание уделено ЧСА, основному переносчику ФС в организме. Указывается на многочисленные сайты возможного связывания ЧСА с ФС и сложность изучения геометрии образовавшихся структур. Описана группа перспективных ФС, представляющих собой производные порфиринов. Отмечена высокая стабильность этих соединений в физиологических условиях, их высокие коэффициенты экстинкции и высокие квантовые выходы генерации синглетного кислорода при фотовозбуждении (0.5-0.7). Указана также возможность дестабилизации структуры квадруплекса, связанного с порфириновым ФС, по причине окисления гуанина

выделившимся синглетным кислородом. Отмечена актуальность развития методов и подходов для экспериментального определения сайтов связывания ФС с G4 и ЧСА. Особо отмечается возможность детектирования множества сосуществующих конформаций при помощи дипольной ЭПР спектроскопии. *В заключении главы I* автор еще раз формулирует цель исследования, обосновывая поставленные задачи актуальностью развития методов импульсной ЭПР спектроскопии для надежного анализа структуры комплексов G4 и ЧСА с ФС, в том числе, в условиях фотовозбуждения.

Глава II посвящена изучению комплексов G4 с ФС на примере теломерной ДНК человека HTel-22 и катионного порфирина TMRyP4. В качестве нитроксильной спиновой метки был использован 3-йодметил-2,2,5,5-тетраметил-3-пирролин-1-оксил, присоединенный к тиофосфатной модификации в олигонуклеотиде (сайты связывания G3, G15). С помощью специальных экспериментов было проверено, что введение спиновых меток не искажает структуру квадруплекса и не влияет на формирование комплекса TMRyP4 с HTel-22. Распределения по расстояниям, полученные для HTel-22 (G3;G15) без ФС-лиганда, демонстрируют бимодальное распределение с пиками на 1.9 нм и 2.8 нм; полученные результаты согласуются с ранее опубликованным исследованием. После фотооблучения комплекса HTel-22 (G3;G15)/TMRyP4 распределение расстояний между спиновыми метками демонстрирует значительное изменение, что свидетельствует о разрушении квадруплексной укладки ДНК. Для определения локализации ФС в комплексе с HTel-22(G3) был использован метод РеФИМД спектроскопии. В этом случае регистрировался сигнал нитроксильной метки, а возбуждение триплетного состояния порфирина происходило при различном положении лазерного импульса относительно микроволновых импульсов. Полученное распределение расстояний оказалось очень широким, что очевидно свидетельствует о наличии нескольких сайтов связывания порфирина с ДНК. Автор особо обращает внимание на значительных вклад расстояний, превышающих 2.3 нм, который может быть интерпретирован на основании локализации порфирина в позиции ART2. Таким образом, полученные данные представляют собой первое экспериментальное подтверждение локализации TMRyP4 в позиции ART2, которая ранее была предсказана на основании моделирования. Путем анализа интенсивности эхо-детектируемых

спектров нитроксильной метки и триплетного ФС было установлено, что в результате фотолиза количество радикалов уменьшается (для триплетного состояния порфирина на 30%, для нитроксильного радикала на 15–20%), что указывает на частичную деградацию TMRyP4 и нитроксильного радикала. Кроме того, данные ДЭЭР для HTeI-22 (G3; G15) после фотолиза демонстрируют появление расстояний в диапазоне от 3.5 до 5 нм, что свидетельствует о фотоиндуцированном «разворачивании» структуры квадруплекса. Помимо разворачивания G4, данные ДЭЭР для моно-меченой производной HTeI-22 демонстрируют образование димерных структур после фотолиза, процент которых можно определить, анализируя глубину модуляции. Фотооблучение в течение одного часа приводит к увеличению доли димеров с $16 \pm 5 \%$ до $36 \pm 5 \%$. В целом, можно заключить, что полученные в главе II данные важны для понимания взаимодействия G4 с порфириновыми ФС, что открывает новые пути для использования порфиринов в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии рака.

Глава III посвящена определению сайтов связывания тетрапиррольных ФС с ЧСА. Для этого были приготовлены комплексы фотоактивных лигандов разной природы (нейтральных, катионных, анионных) со спин-меченым сывороточным альбумином. В качестве спиновой метки использовался метантиосульфонатный радикал. Для повышения эффективности мечения проводилось предварительное мягкое восстановление тиольной группы альбумина (Cys34). С помощью моделирования стационарных спектров ЭПР было установлено, что восстановление не изменяет место присоединения спиновой метки, а также равновесные конформационные состояния кармана Cys34. Путем оптической спектроскопии было показано, что все ФС-лиганды, связанные с ЧСА, образуют триплетные возбужденные состояния под действием лазерного импульса 532 нм. С помощью дипольной ЭПР-спектроскопии было получено распределение расстояний между фотовозбужденными триплетными состояниями связанных тетрапиррольных ФС и нитроксильной спиновой меткой, введенной в положение Cys-34 альбумина, а также определены относительные вклады каждого пика, что позволило оценить заселенность соответствующих сайтов связывания. Оказалось, что для всех анионных ФС сайты гема и Садлоу I участвуют в

связывании одновременно, но их относительная афинность существенно зависит от структуры лиганда. Так, для ФеоА основным сайтом связывания оказался сайт гема (пик при 2.6 нм), что ожидаемо для лиганда небольшого размера, который может полностью входить в небольшой карман альбумина. Большой размер порфиринов с периферическими группами (TSPP, DCPP и TCPP) препятствует их полному проникновению в сайт гема. Вместо этого основным местом связывания становится сайт Садлоу I. Автор особо отмечает тот факт, что полученные данные не полностью соответствуют результатам теоретического моделирования, что подчеркивает важность развития независимых экспериментальных методов анализа структуры комплексов ФС с биологическими молекулами. Распределение расстояний для нейтральных и катионных порфиринов показало разнообразное мультисайтовое связывание, которое нельзя было предсказать на основе существующих знаний. Таким образом, с помощью независимого эксперимента впервые была построена карта сайтов связывания фотоактивных лигандов с ЧСА.

Применение спиновых меток на основе фотовозбужденного триплетного состояния имеет серьезное ограничение на частоту повторения лазерных импульсов. По этой причине разработка методов и подходов к повышению интенсивности регистрируемого сигнала является насущной задачей ЭПР спектроскопии с фотовозбуждением. В главе IV представлены результаты исследования эффективности и ограничений подхода к сокращению времени накопления сигнала, основанного на применении многократного эхо-детектирования с использованием последовательностей динамической развязки (в частности, последовательности типа Карра–Парселла–Мейбума–Гилл). Основные результаты были получены для порфирина TMRyP4 и диады C60TAM. Нужно отметить, что для получения надежных данных в данной работе была выполнена замена стандартного АЦП спектрометра Bruker SpecJetII на высокоскоростной АЦП M4i.2211-x8. Представленный выигрыш в соотношении сигнал/шум для TMRyP4, C60 и TAM составляет в среднем около 2.5-3.5 в зависимости от системы и количества просуммированных эх. Таким образом, применение КПИМГ демонстрирует заметную эффективность и может быть успешно использовано для повышения чувствительности экспериментов с

триплетными состояниями спиновых меток. Автор отмечает, что эффективность предложенного подхода критически зависит от мощности лазерного импульса, причем негативное влияние флуктуации мощности наиболее выражено в системах с интенсивным фотоиндуцированным сигналом ЭПР.

Таким образом, в научно-квалификационной работе Санниковой Н.Э. представлены **новые результаты** исследования структуры комплексов фотосенсибилизаторов порфиринового типа с биологическими молекулами, а именно, квадруплексами ДНК и человеческим сывороточным альбумином. Разработанные подходы позволили выявить множественные сайты связывания ФС и определить вклад каждой конфигурации. Необходимо особо отметить, что предложенная методика не требует каких-либо априорных знаний о структуре изучаемых веществ и, следовательно, позволяет анализировать сложные биологические системы «как они есть». Многократное эхо-детектирование позволяет увеличить соотношение сигнал/шум в несколько раз, значительно повышая точность экспериментов. Разработанные в настоящей работе методы и подходы имеют безусловную **научную и практическую значимость**. Предложенные выводы **полностью обоснованы** приведенными экспериментальными данными.

Диссертационная работа Санниковой Н.Э. хорошо оформлена, все эксперименты и расчеты подробно описаны, текст содержит все необходимые иллюстрации и пояснения. По материалам диссертации опубликованы 8 работ, в том числе 4 статьи в журналах, входящих в «Перечень журналов ВАК», и 4 тезиса докладов на научных конференциях. **Автореферат полностью отражает содержание диссертации.**

Ниже представлены основные **замечания** по содержанию диссертационной работы.

1) На рисунке 13 приведены данные об оптической плотности ТМРуР4 в зависимости от концентрации немодифицированного НТел-22 и его спин-меченых аналогов. Визуально все три графика выглядят похожими. Для выяснения степени влияния спиновых меток следовало привести три зависимости на одном рисунке и указать погрешности измерения оптической плотности.

2) Из рисунка 14 без указания погрешностей также трудно оценить влияние спиновых меток на долю связанного фотосенсибилизатора.

3) Из текста к рисунку 18 не ясно, какие данные, отраженные на этом рисунке, заимствованы из литературы, а какие являются результатом настоящей работы.

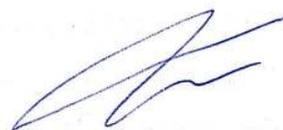
4) Недостаточно хорошее качество моделирования стационарных спектров ЭПР, приведенных на рисунках 22 и 23, ставит вопрос о правомерности используемой модели, в частности, о необходимости введения в рассмотрение ориентирующих потенциалов.

Перечисленные замечания не снижают значимости диссертационного исследования.

Диссертационная работа отвечает всем критериям, установленным ВАК России для кандидатских диссертаций, а ее автор, Санникова Наталья Эдуардовна, заслуживает присвоения учёной степени кандидата наук.

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

Официальный оппонент:
доктор химических наук,
Чумакова Наталья Анатольевна



12.01.2026

Контактные данные:

тел.: 7(916)7974879, e-mail: harmonic2011@yandex.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

02.00.04 – Физическая химия

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, лаборатория кинетики механохимических и свободнорадикальных процессов им. В.В. Воеводского (0154)

Тел.: 7(495)9397345; e-mail: natalia_chumakova@chph.ras.ru

Подпись сотрудника Чумаковой Н.А. удостоверяю

ученый секретарь ФИЦ ХФ РАН

Михалева М.Г.



12.01.2026