

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Санниковой Натальи Эдуардовны

«РАЗВИТИЕ МЕТОДОВ ИМПУЛЬСНОЙ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ С ФОТОВОЗБУЖДЕНИЕМ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ БИМОЛЕКУЛ С ФОТОАКТИВНЫМИ ЛИГАНДАМИ»,
представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества

Исследование физико-химических механизмов воздействия терапевтических средств лечения социально значимых паталогических состояний человека на биологические макромолекулы является одной из важнейших задач химической физики. Малоинвазивные способы лечения онкологических заболеваний, к которым относится метод фотодинамической терапии (ФДТ), находят всё более широкое применение в клинической практике. Поэтому исследование взаимодействия биосовместимых молекул фотосенсибилизаторов (ФС), используемых в ФДТ, и структуры их комплексов с биологическими молекулами-мишенями и транспортными макромолекулами сыворотки крови является **важным, актуальным и практически значимым.**

Активной формой молекул ФС является их триплетное состояние, возникающее под воздействием света подходящего спектрального состава. Взаимодействие триплетных молекул ФС с триплетными молекулами кислорода приводит к появлению активной синглетной формы кислорода по механизму триплет-триплетной аннигиляции, деструктивное воздействие активных форм кислорода и продуктов их реакций на раковые клетки используется в ФДТ. Триплетные молекулы также являются парамагнитными метками/зондами, обладающими высокой неравновесной поляризацией, что даёт возможность изучать биологические системы методами импульсного, времяразрешённого или стационарного ЭПР в условиях, близких к естественным по концентрациям молекул. Использование триплетных спиновых меток в комбинации со стабильными спиновыми метками, введёнными в определённые положения биологической молекулы, позволяют проводить структурные исследования образующихся комплексов методами импульсной дипольной спектроскопии (ИДС), которые являются адекватным средством решения поставленных в работе структурных задач. В качестве ФС использованы несколько замещённых порфиринов, имеющих различное зарядовое состояние (катионные, анионные и нейтральные формы при физиологических значениях pH). В качестве

модельной мишени ФДТ в диссертации выбраны спин-меченые G-квадруплексы HTel-22 (G4-ДНК), играющие важную роль в процессе репликации ДНК. Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), меченый нитроксильной спиновой меткой по единственной доступной SH группе молекулы белка, выбран как потенциальный доставщик молекул ФС - порфиринов к месту проведения ФДТ, а метод ИДС использован для изучения мест связывания молекул ФС (после их перевода световым импульсом в триплетное состояние) с этим спин-меченым транспортным белком.

Диссертационная работа, выполненная Натальей Эдуардовной Санниковой, является фундаментальным экспериментальным исследованием в области химической физики, имеющим также методическое и прикладное значение. Диссертация имеет объём 120 страниц, состоит из введения, 4-х глав, первая из которых является литературным обзором, 2-я и 3-я содержат результаты по структуре комплексов ФС с молекулами-мишенями, а последняя посвящена повышению отношения сигнал/шум в экспериментах за счёт использования импульсной последовательности Карра-Парселла-Мейбума-Гилл (КПМГ) и имеет важное методическое значение, основных результатов и выводов работы, списка сокращений, благодарностей и списка литературы из 275 наименований. Работа содержит 43 рисунка и 7 таблиц.

Во **введении** автором обоснована актуальность работы, описана степень разработанности темы исследования, сформулированы цели и задачи диссертации, показаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, описаны методология и методы исследования, приведены положения, выносимые на защиту, описан личный вклад соискателя, перечислены конференции, где работа прошла апробацию, приведён список статей, в которых опубликованы основные результаты исследования, обосновано соответствие диссертации специальности 1.3.17, оценена степень достоверности полученных результатов, и приведена краткая характеристика работы.

Первая глава диссертации представляет собой литературный обзор, состоящий из трёх частей. В первой части подробно описаны особенности ЭПР-спектроскопии триплетных состояний молекул, в том числе проанализирован подход с использованием метода динамической развязки в экспериментах по ИДС, описаны стандартные способы решения обратной задачи определения структурных параметров системы по измеренным сигналам импульсного ДЭЭР, рассмотрены дополнительные возможности, возникающие при использовании фотоиндуцированных триплетных спиновых меток (генерация меток в заданный момент времени импульсом лазера и значительная неравновесная поляризация

их спинов). Вторая часть посвящена описанию структурных и функциональных особенностей систем, выбранных для исследования: G-квадруплексов ДНК как молекулярных мишеней ФДТ и молекул ЧСА как транспортных молекул для переноса ФС, также обоснован выбор в качестве фотосенсибилизаторов нескольких биосовместимых молекул порфиринового ряда, имеющих различный заряд при физиологических значениях pH. В третьей части обзора на основе тщательного анализа литературных данных в двух предыдущих частях сформулирована цель диссертации и перечислены задачи, решение которых достаточно для достижения поставленной цели. Литературный обзор имеет объём 31 стр., охватывает все аспекты, важные для выполнения исследования и показывает хорошее знакомство автора с современной литературой как в области импульсной радиоспектроскопии, в том числе с применением фотоиндуцированных спиновых меток, так и в области структурных и функциональных особенностей биологических макромолекул, выбранных для изучения.

Во **второй главе** описаны результаты комбинированного применения метода ИДС и фотоиндуцированной ЭПР спектроскопии для изучения структурных трансформаций G4-ДНК при образовании их молекулярных комплексов с молекулами ФС, возникающих в условиях проведения ФДТ. Комбинация методов была применена впервые для исследования ДНК. Использование нативных, однократно и двукратно меченых нитроксильными спиновыми метками молекул G4-ДНК позволило надежно установить сайты связывания ФС TMRyP4, в том числе впервые экспериментально подтвердить сайт адсорбции на нижней тетраде антипараллельной формы квадруплекса, предсказанный ранее на основе молекулярного моделирования. Экспериментально доказаны процессы структурных перестроек G4-ДНК при воздействии светового потока (источник 60 мвт, диапазон 485-800 нм) на его комплекс с TMRyP4, приводящие к разворачиванию исходной квадруплексной структуры и увеличению доли димеров более чем вдвое при часовом облучении.

В **третьей главе** метод ИДС с использованием фотовозбуждённых триплетных спиновых меток порфиринового ряда с различным зарядовым состоянием (катионные, нейтральные и анионные формы) применён для определения сайтов их нековалентного связывания с молекулой человеческого сывороточного альбумина, спин-меченого с помощью нитроксильного радикала по единственной доступной тиоловой группе ЧСА. Положение нитроксильной спиновой метки фиксировано по отношению к молекуле ЧСА, метод ИДС позволяет определять расстояние между адсорбированной молекулой ФС в триплетном состоянии и нитроксильной группой. Ранее в основном оптическими методами (FRET –

Фёрстеровкий резонансный перенос энергии) были идентифицированы несколько сайтов адсорбции некоторых молекул порфиринового ряда. В диссертации продемонстрирована возможность определения относительной заселённости сайтов при конкурентной адсорбции на них молекул ФС. Помимо ранее известных мест посадки найдены новые и уточнены положения существующих, поскольку решение обратной задачи ИДС позволяет получить функцию распределения по расстояниям между метками в системе в диапазоне 1.5 – 8 нм. Показано, что изученные порфирины в катионной форме адсорбируются исключительно на поверхности молекулы ЧСА, нейтральный порфирин также адсорбируется на поверхности, но еще участвует в связывании с гем-специфическим сайтом, тогда как отрицательно заряженные порфирины связываются только специфически с ранее известными гем-сайтом и Садлоу I.

В четвёртой главе проведено важное в методическом отношении исследование влияния применения блоков динамической развязки КПМГ с суммированием сигналов эха на отношение сигнал/шум в экспериментах фотоиндуцированной ИДС. В условиях, когда в эксперименте используется импульсный лазер для генерации триплетных молекул, частота повторения его импульсов может лимитировать скорость накопления сигнала. Использование суммирования многократно рефокусированных сигналов спинового эха в принципе позволяет увеличить отношение сигнал/шум и уменьшить тем самым время проведения эксперимента. В данной главе проведён теоретический анализ и экспериментальные измерения эффекта динамической развязки. Экспериментально продемонстрировано, что использование блоков импульсов не приводит к искажению распределения по расстояниям между метками в ИДС с триплетными метками. Показано, что при измерении сигнала триплетных меток важным источником шумов являются флуктуации мощности лазера. Найдены условия оптимального применения блока динамической развязки для различных схем фотоиндуцированной ЭПР спектроскопии.

Наиболее важными и новыми научными результатами диссертации являются:

1. Экспериментальное доказательство механизма структурной деградации при фотолизе комплекса квадруплекса G4-ДНК с порфирином TMRyP4, приводящего к разворачиванию исходной G-квадруплексной формы.
2. Определение сайтов конкурентного связывания порфиринов, имеющих различный электрический заряд в физиологических условиях, с молекулой спин-меченого сывороточного альбумина человека, методами фотоиндуцированной импульсной дипольной спектроскопии. Доказательство возможности изучения

одновременного связывания молекул порфирина с несколькими сайтами адсорбции.

3. Разработка метода повышения отношения сигнал/шум в экспериментах по импульсной дипольной спектроскопии с генерацией триплетных спиновых меток с помощью импульсного лазера за счёт использования импульсных последовательностей динамической развязки КПИМГ, приводящего к сокращению времени измерения сигнала без потери точности восстановления распределения по расстояниям между спиновыми метками в системе.

Результаты и выводы работы получены в результате анализа стандартными методами тщательно проведённых воспроизводимых спектроскопических измерений хорошо охарактеризованных образцов, прошли апробацию на нескольких конференциях, поэтому являются надёжно обоснованными и не вызывают сомнений.

По существу работы замечаний не имею, но отмечу несколько недостатков.

1. В работе используется несколько раз (начиная со стр.46) транслитерация английского слова glycerol, «глицерол» вместо «глицерин».
 2. При обсуждении методов решения обратной задачи определения распределения по расстояниям между неспаренными электронами по экспериментальным данным, полученным методом ДЭЭР (стр. 26-28), было бы уместно сослаться на преобразование Меллина как точный непараметрический метод решения обратной задачи, разработанный в ИХКГ СО РАН (DOI:10.1039/C7CP04059H, 2017г.).
 3. В подразделе 3.2 (экспериментальная часть главы 3), стр.64, начало 2-го абзаца, в описании импульсной последовательности ФИМД сказано, что лазерный импульс предваряет СВЧ импульсы, тогда как он производится после последнего из них, причём окончание фразы даёт правильную информацию, как и показано на рис.4.
- Приведенные замечания не имеют принципиального характера и не снижают общую высокую оценку работы.**

Автореферат и опубликованные статьи достаточно полно отражают содержание диссертации. Материалы диссертации опубликованы в 4-х статьях в журналах, входящих в список ВАК и индексируемых в Web of Science, и прошли апробацию на шести российских и международных конференциях. По данным РИНЦ статьи с участием автора процитированы 59 раз. Судя по опубликованным работам, Наталья Эдуардовна Санникова проявила себя как сформировавшийся высококвалифицированный исследователь, способный формулировать и решать задачи фундаментального и методического характера в области химической физики, в том числе участвуя в междисциплинарных проектах биомедицинской направленности.

Считаю, что диссертационная работа «Развитие методов импульсной ЭПР-спектроскопии с фотовозбуждением для исследования комплексов биомолекул с фотоактивными лигандами» является цельным научным исследованием, соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в том числе отвечает критериям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в действующей редакции), а ее автор, Санникова Наталья Эдуардовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

Официальный оппонент

Марьясов Александр Георгиевич
кандидат физико-математических наук
специальность 01.04.17 - химическая физика, в том числе физика горения и взрыва
старший научный сотрудник лаборатории магнитной радиоспектроскопии

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова
Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН)
Российская Федерация, 630090. г. Новосибирск, проспект Акад. Лаврентьева, д.9
Тел. 8(923) 137 73 68,
Электронная почта: maryasov@nioch.nsc.ru
06.02.2026

Согласен на включение моих персональных данных в документы,
связанные с работой диссертационного совета, и их дальнейшую обработку.

Подпись Марьясова А.Г. заверяю

Ученый секретарь НИОХ СО РАН

к.х.н.

06.02.2026



Р.А. Бредихин