

«Утверждаю»

Проректор — начальник Управления
научной политики и организации
научных исследований МГУ имени
М.В. Ломоносова
профессор, д.ф.-м.н. Федянин А.А.

и.и.



ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Стрижакова Родиона Константиновича на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.17 – Химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

Диссертационная работа Р.К. Стрижакова выполнена в актуальной области медицинской и биологической физики – поиск и тестирование новых спиновых меток и спиновых зондов для исследования сложных систем, в том числе биологических жидкостей и живых организмов, методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Метод ЭПР в варианте методик спинового зонда и спиновой метки уже несколько десятилетий широко применяют для получения информации о характере локализации и равномерности распределения спиновых зондов в различных средах, о конформациях молекул, в том числе белков и нуклеиновых кислот, к которым адресно привиты спиновые метки. Такой подход позволяет получать информацию о подвижности, взаимном расположении и ориентациях парамагнитных молекул, а также о таких свойствах среды, как полярность, рН, содержание кислорода, свободных радикалов и других компонентов, способных вступать в окислительно-восстановительные процессы. Несмотря на то, что в данной области работает большое количество научных коллективов, немало задач остаются нерешенными. Одной из проблем, которую не удалось решить до сих пор, является низкая стабильность нитроксильных радикалов, которые наиболее часто применяют в биофизических исследованиях, по отношению к биогенным окислительно-восстановительным агентам. Другой проблемой является относительно высокая анизотропия тензора сверхтонкого взаимодействия нитроксильных радикалов, что в случае заторможенных движений неориентированных зондов или меток приводит к заметному уменьшению амплитуды сигнала ЭПР. Поэтому поиск новых стабильных малотоксичных зондов или меток, позволяющих исследовать ткани живых организмов методами ЭПР спектроскопии и томографии *in vitro* и *in vivo*, несомненно, является актуальным.

Эта задача определяет и научную новизну исследований и выводов диссертационной работы Р.К. Стрижакова, которая заключается в определении возможности использования новых, недавно синтезированных нитронилнитроксильных радикалов (ННР), а также новых тритильных радикалов в качестве зондов и меток *in vivo*. Такие классы парамагнитных молекул, как ННР и тритильные радикалы, и ранее рассматривались как перспективные объекты для биофизических исследований. Р.К. Стрижаков впервые определил магнитно-резонансные параметры новых стабильных радикалов. В работе была изучена стабильность как самих ННР, так и аддукта одного из них с циклодекстрином. Было показано, что эти соединения недостаточно стабильны для исследования содержания NO в тканях, быстро выводятся из них и поэтому не перспективны как спиновые метки, что является хоть и отрицательным, но новым и полезным результатом. Гораздо более стабильными, как показано в диссертационной работе, являются ННР со спироциклическими заместителями, что определяет

перспективность их применения для структурных исследований биополимеров. Впервые установлен механизм электронной спиновой релаксации радикалов такого типа в матрице трегалозы при 300 К. Впервые определен ряд свойств новых тритильных радикалов, в том числе значений тензора сверхтонкого взаимодействия неспаренного электрона с ядрами ^{13}C , установлены количественные закономерности сольволиза некоторых тритильных радикалов.

В результате проведенных исследований была показана перспективность применения ряда нитроксильных и тритильных радикалов в качестве спиновых меток и спиновых зондов для структурных биофизических измерений как с точки зрения релаксационных, так и окислительно-восстановительных свойств, что определяет практическую значимость диссертации.

Диссертационная работа Р.К. Стрижакова состоит из введения, пяти глав, в том числе литературного обзора, методической главы, выводов, списка литературы из 204 наименований и пяти приложений, изложена на 129 страницах, содержит 11 таблиц и 48 рисунков.

Во введении обоснованы актуальность темы диссертации, ее новизна, выбор объектов и методов исследования, сформулирована цель и основные задачи работы, приведены положения, выносимые на защиту, и краткое содержание глав диссертации. Следует отметить, что актуальность работы в диссертации изложена более чем на трех страницах, что мешает выделить логическую последовательность, приводящую к формулировке цели работы. К счастью, этот недостаток в автореферате исправлен.

Обзор литературы, являющийся первой главой, грамотно отражает имеющийся задел в области, которой посвящена диссертация. В первом разделе рассмотрены как общие вопросы применения нитроксильных и тритильных радикалов как спиновых зондов и спиновых меток, так и достоинства и недостатки такого подхода к исследованию живых систем. В следующих разделах эти проблемы рассматриваются более подробно, в частности описан механизм восстановления нитроксильных радикалов аскорбиновой кислотой, влияние заместителей около нитроксильной группы на стабильность парамагнитных молекул. Рассмотрены подходы к увеличению стабильности путем ковалентного связывания с молекулами, имеющими полости, в частности с циклодекстрином, за счет пространственного экранирования радикального фрагмента. В обзоре также изложены основы методов исследования, применяемых в работе, прежде всего импульсного ЭПР (PELDOR, DQC). К сожалению, описание подходов с использованием ЭПР томографии в этой главе отсутствует. В конце обзора сделан общий вывод и еще раз, теперь уже более предметно, обоснована постановка цели и конкретных задач, что, безусловно, является достоинством диссертации.

Во второй главе приведены результаты исследований, позволяющие проанализировать возможность применения ННР в качестве спиновых зондов в ЭПР томографии *in vivo*. Автором диссертационной работы определены магнитно-резонансные параметры двух новых ННР, проанализирована кинетика восстановления их аскорбиновой кислотой, а также кинетика гибели в среде крови крыс. Показано, что при больших концентрациях зондов их можно использовать для ЭПР томографии. Однако результаты ЭПР томографии мышей показали, что данные ННР невозможно использовать *in vivo* из-за быстрого выведения их в мочевой пузырь и относительно быстрого восстановления биогенными восстановителями. Результаты МРТ также показали их низкую эффективность. К сожалению, попытка стабилизировать ННР с помощью ковалентного связывания с циклодекстрином не удалась, но автор на основании полученных результатов предполагает, что использование более длинного линкера может облегчить вхождение метки в полость наноконтейнера.

В главе 3 диссертации описаны свойства ряда новых нитроксильных радикалов со спироциклическими фрагментами около нитроксильной группы. Были измерены их магнитно-резонансные параметры, константы скорости их восстановления аскорбиновой

кислотой, а также времена спин-спиновой и спин-решеточной релаксации при иммобилизации их в матрице трегалозы при комнатной температуре. Показано, что такие радикалы обладают существенно более высокой стабильностью по отношению к биогенным восстановителям по сравнению с их тетраметильными аналогами и являются перспективными для структурных исследований биополимеров при низких температурах, а также для измерений окислительно-восстановительного статуса методами ЭПР и МРТ в биомедицинских исследованиях.

В четвертой главе рассмотрены магнитно-резонансные параметры тритильных радикалов. Показано, что константы СТВ с ядрами ^{13}C практически не зависят от структуры и количества заместителей, присоединенных к тритильному ядру по карбоксильным группам последнего. Обнаружено отсутствие заметного влияния растворителя на величины a_n . Обнаружена большая ширина спутанных линий, соответствующих СТВ с ядром ^{13}C центрального атома углерода тритильного радикала, обусловленная, вероятно, модуляцией анизотропии константы СТВ. Зарегистрировано превращение радикалов с 1–3 ацетоксиметоксильными группами в один и тот же трикарбоксильный тритильный радикал в водных средах и метаноле.

Пятая глава представляет собой описание материалов и методов, использованных в работе, в том числе условия регистрации и моделирования спектров ЭПР, ЭПР томографии мышц, измерения стабильности и реакционной способности радикалов.

Диссертация написана неплохим языком и хорошо оформлена. Результаты работы опубликованы в пяти статьях в ведущих международных журналах, входящих в список ВАК, и апробированы на многочисленных международных и российских конференциях. Публикации в полной мере отражают материал диссертации. Автореферат, несмотря на довольно малый объем (16 стр.), полностью соответствует основным положениям диссертации. Работа выполнена на современном научном уровне и представляет собой завершенное исследование. Полученные в ней результаты имеют существенное научное значение, развивают знания в области биохимической физики и расширяют круг стабильных радикалов, которые могут быть использованы как спиновые зонды и спиновые метки. Результаты работы могут быть использованы во многих организациях, в том числе в МГУ имени М.В. Ломоносова, Институте химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, в Институте биохимической физики РАН, в Институте проблем химической физики РАН, в Институте химической кинетики и горения СО РАН, в Международном томографическом центре СО РАН, в Институте органической химии СО РАН, в Казанском физико-техническом институте и других.

Однако при общей высокой оценке диссертационной работы она не свободна от некоторых недостатков:

1. В разделе 2.10 работы, в котором рассмотрены кинетические закономерности восстановления ННР аскорбиновой кислотой, на основании того, что «аскорбиновая кислота находится в двукратном избытке по сравнению с нитроксильным радикалом при той же концентрации» делается вывод о том, что «эту реакцию можно рассматривать как реакцию псевдо-первого порядка». Даже отбросив стилистические погрешности такого утверждения, отметим, что данное упрощение допустимо только при десятикратном и большем избытке одного из реагентов.
2. Непонятно, почему в подписи к рисунку 2.3, на котором приводятся кинетические кривые для реакции с NN1 дано рассчитанное значение для константы скорости для NN2.
3. Вместо термина «экспоненциальная шкала» (например, в подписи к рис.2.4) следует использовать выражение «полулогарифмические координаты».
4. На странице 63 написано, что спектры были «промоделированы... в модели медленного вращения» и для каждой системы приведено одно значение времени вращательной корреляции. Однако в диссертации модель не описана подробно, и, исходя из геометрического строения радикалов, нельзя априори пренебрегать анизотропией вращения.

5. В главе 5 приведены использованные мощности микроволнового излучения, в некоторых случаях превышающие 10 мВт. В качестве рекомендации предлагаем приводить кривые насыщения сигнала ЭПР.

6. В целом диссертация написана хорошим литературным языком, однако в ней присутствуют выражения, не соответствующие стилю написания научных трудов, например «Процедура «заморозка-откачка» в оглавлении. Автор, на наш взгляд, злоупотребляет словами «исследование» и «изучение», вместо которых можно использовать более конкретные термины, описывающие, какие свойства, закономерности, количественные характеристики и т.д. установлены или получены в эксперименте.

Отмеченные замечания, вместе с некоторыми несущественными опечатками, ни в кой мере не снижают ценности диссертационной работы Р.К. Стрижакова.

Доклад по диссертации был заслушан на заседании кафедры химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Диссертация, автореферат и отзыв ведущей организации были одобрены единогласно (протокол №10 от 30.11.2016).

Диссертация соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г., в которой решена задача выявления потенциала применения ряда новых нитроксильных и триарилметильных радикалов в качестве спиновых меток и спиновых зондов в ЭПР томографии и для определения структуры и функций биополимеров, что имеет значение для развития биохимической физики. Автор диссертации Стрижаков Родион Константинович заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

Ведущий научный сотрудник
кафедры химической кинетики
химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова,
доктор химических наук, доцент

Голубева Елена Николаевна

Почтовый адрес: Москва, 119991, ул. Ленинские горы, 1
Телефон: +7(495)9391012
e-mail: legol@mail.ru

30 ноября 2016 г.