

О Т З Ы В

официального оппонента

на диссертационную работу Стрижакова Родиона Константиновича
« *Исследование магнитно-резонансных и функциональных свойств
нитроксильных и тритильных радикалов*»,

представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.17 - химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

Метод спиновых меток и зондов активно развивается в течение более полувека и стал во многом рутинным инструментом в различных областях химической физики, физической химии, физико-химической биологии, вплоть до медицины. В качестве спиновых меток и зондов используются парамагнитные ионы и стабильные радикалы, в основном нитроксильные (НР). В последние годы синтезированы достаточно стабильные триарилметильные радикалы (ТАМ), обладающие узким спектром ЭПР, что дает им в некоторых случаях серьезное преимущество над нитроксильными, позволяя увеличить чувствительность измерений. Спиновые метки и зонды используются для изучения структуры ближайшего окружения неспаренного электрона в месте его локализации в исследуемом объекте; локальной динамики молекул и их фрагментов; реакций химически активных частиц с метками и зондами, сопровождающиеся изменениями спектров ЭПР; взаимодействия с другими парамагнитными частицами (например, молекулярный кислород, окись азота, другие метки и зонды) для определения их концентраций, пространственного расположения, и п.т. В настоящее время продолжается поиск и синтез новых НР и ТАМ, обладающих в некотором смысле улучшенными свойствами - повышенной химической стабильностью по отношению к химическим субстанциям, содержащимся в организменных жидкостях для использования в экспериментах *in vivo*, замедленными процессами фазовой релаксации для исследований биообъектов при физиологических, а не криогенных температурах. В НИОХ и МТЦ СО РАН синтезированы новые радикалы, подлежащие всесторонней характеристике как спиновые метки и зонды для использования в биофизических и медицинских исследованиях. Поэтому тема диссертации представляется важной и актуальной.

Диссертация общим объемом 127 страниц состоит из введения и пяти глав, включающих обзор литературы по использованию НР и ТАМ в качестве спиновых меток и зондов; 3-х глав, где представлены результаты изучения химической устойчивости ННР и их применимости в ЯМР и ЭПР томографии, химической

устойчивости по отношению к восстановлению аскорбиновой кислотой и парамагнитной релаксации бис(спироциклогексил) и этилзамещенных нитроксидов, магнитно-резонансных параметров и сольволиза ТАМ; главы, содержащей информацию об использованных приборах, экспериментальных методах и материалах; результатов и выводов; списка обозначений и сокращений; списка литературы из 188 пунктов; списка публикаций по теме диссертации; благодарностей и 5-ти одностраничных приложений с экспериментальными данными. Работа содержит 49 рисунков и 12 таблиц. Каждая глава снабжена кратким заключением, что облегчает знакомство с диссертацией.

Во введении правильно и четко обоснованы актуальность работы, выбор методов и объектов, постановка задачи и цели исследования, выносимые на защиту положения, сведения об апробации работы, личном вкладе соискателя и краткое описание диссертации.

В первой главе приведены и проанализированы литературные данные по следующим направлениям. Кратко перечислены области применения спиновых меток и зондов в биофизических исследованиях, подробно описаны химические процессы, происходящие при восстановлении НР аскорбиновой кислотой, проанализированы данные по влиянию структуры радикалов на их устойчивость к восстановлению в биологических средах, рассмотрены работы по изучению аддуктов НР и циклодекстринов, дано представление об использовании НР и ТАМ в структурной биологии, проанализированы возможности импульсных методов ЭПР для изучения структуры белков. Подробно описано применение ТАМ как зонда на кислород (оксиметрия), а ННР как зондов на оксид азота. Глава заканчивается детальной формулировкой постановки задачи исследования. Материалы этой главы свидетельствуют о глубоком знании соискателем литературы по рассматриваемым проблемам.

Во второй главе представлены результаты исследования новых малотоксичных водорастворимых ННР в качестве зонда на оксид азота в ЭПР томографии и изучена возможность повышения химической устойчивости этих радикалов за счет образования аддукта с циклодекстрином. Изучены скорости восстановления радикалов аскорбиновой кислотой в буферном растворе, в крови и ее компонентах. Продемонстрирована реакция ННР с NO *in vitro*, сопровождающаяся трансформацией спектра ЭПР. Изучена локализация радикала и ее динамика *in vivo* методом ЭПР томографии при внутривенном введении радикала в организм мыши. Устойчивость изученных радикалов к воздействию биогенных восстановителей оказалась

недостаточно высока, чтобы наблюдать продукты взаимодействия спинового зонда с NO в организме. Высокая растворимость в воде и низкая липофильность дали возможность проводить наблюдение радикалов в крови более часа, однако в результате оказалось, что выводящая система животного быстро аккумулирует радикал в мочевом пузыре (данные также подтверждены ЯМР томографией, где радикал выполнял роль релаксационного зонда), что не позволяет получить полезную информацию с его помощью. Попытки усилить экранирование неспаренного электрона и таким образом повысить химическую устойчивость радикала за счет образования супрамолекулярного аддукта с циклодекстрином не дали желаемого эффекта, по-видимому, из-за слишком коротких линкеров, использованных в эксперименте.

В третьей главе изучены системы, позволяющие исследовать биологические макромолекулы при температурах вплоть до физиологических. Обычные тетраметилзамещенные НР имеют особенность, ограничивающую их использование в широком диапазоне температур – вращение метильных групп приводит к эффективной фазовой релаксации электронного спина в области температур, где этот тип движения размораживается, что не позволяет проводить измерения импульсными методами ЭПР, в том числе используемым для структурных исследований дважды меченых молекул – PELDOR, DQC, RIDME. Замена четырех метильных групп на две спироциклогексильные, либо на 4 этильные приводит к серьезным изменениям парамагнитной релаксации НР. В работе систематически изучены более десятка замещенных НР наряду с их тетраметильными «оригиналами». Исследована устойчивость водорастворимых радикалов по отношению к восстановлению аскорбиновой кислотой. Скорости реакции замещенных НР уменьшились до 3-х раз по сравнению тетраметильными. Изучена парамагнитная релаксация новых радикалов при их иммобилизации в трегалозе – дисахариде-криопротекторе, используемом некоторыми растениями и насекомыми для защиты от замерзания и дегидратации. Показано, что при комнатной температуре все изученные замещенные радикалы имеют примерно одинаковое время фазовой релаксации, около 700 нс, что позволяет измерять расстояния между метками порядка 2 нм без особых ухищрений. Измеренные эходетектируемые спектры ЭПР замещенных радикалов демонстрируют особенности, характерные для либрационной подвижности нитроксильного фрагмента иммобилизованных меток.

В четвертой главе изучены магнитно-резонансные параметры ГАМ и их сольволиз. Синтезированный дейтерозамещенный радикал имеет узкие линии ЭПР, что

позволило измерить константы СТВ на ядрах ^{13}C остова молекулы при естественном содержании изотопа в образце. Оказалось, что эти константы практически не зависят от вида периферических заместителей и от полярности растворителя. Линии ЭПР радикала с изотопзамещенным центральным атомом углерода имеет существенно большую ширину, чем остальные, что свидетельствует о значительной величине анизотропии сверхтонкого взаимодействия неспаренного электрона с этим ядром. Обнаружено, что ГАМ с эфирными ацетоксиметоксильными заместителями отщепляют эту группу в воде и метаноле, автором измерены константы скорости сольволиза.

Наиболее важными новыми результатами, полученными в диссертационной работе Стрижакова Р.К., являются следующие:

1. Бис-спироциклогексилзамещенные нитроксильные радикалы пирролинового ряда являются более устойчивыми по отношению к действию восстановителей и являются перспективными спиновыми метками для структурных исследований биополимеров. Иммуобилизация в матрице трегалозы этих радикалов позволяет проводить измерения импульсными методами ЭПР при комнатной температуре. Фазовая релаксация иммобилизованных радикалов обусловлена либрациями нитроксильного фрагмента около положения равновесия и определяется матрицей, но не строением радикала.
2. Измерены константы сверхтонкой структуры ядер ^{13}C нескольких триарилметильных радикалов при естественном содержании изотопа с различными периферическими заместителями. Показано отсутствие зависимости этих констант как от природы заместителей, так и от полярности растворителя.
3. Подробное изучение свойств новых нитронилнитроксильных радикалов показало их непригодность как меток на оксид азота *in vivo* в ЭПР томографии, несмотря на возможность их достаточно долгого существования в организме мыши, из-за их быстрого попадания в выделительную систему.

Диссертация содержит тщательно выполненные и подробно обсужденные данные, не оставляющие сомнений в их достоверности и обоснованности указанных выше выводов. Защищаемые положения не противоречат известным достижениям фундаментальных и прикладных научных дисциплин.

По существу работы у меня есть следующие замечания:

1. На рис. 3.5 приведены данные по разложению радикалов в 0.1 М фосфатном буферном растворе 0.1 М раствором аскорбиновой кислоты. Не ясно, хватало ли емкости буферного раствора для поддержания pH 7.2 в ходе реакции, поскольку

аскорбиновая кислота достаточно сильная, а ее концентрация совпадает с концентрацией фосфата.

2. Измерения времени спин-решеточной релаксации радикалов проводились методом инверсия - восстановление. Метод дает кинетику релаксации продольной намагниченности образца при условии полного возбуждения спектра. В условиях неполного возбуждения нужно элиминировать (или контролировать) влияние спектральной диффузии (СД), поскольку она перераспределяет возбуждение (дырку, созданную инвертирующим импульсом) по спектру без продольной релаксации намагниченности, что приводит к уходу начального возбуждения из области, дающей вклад в сигнал спинового эха, т.е. к кажущемуся ускорению релаксации. В работе достоверно показано, что во многих случаях форма эхo-детектируемых спектров ЭПР НР определяется либрационной подвижностью радикалов. Хорошо известно, что движение радикалов приводит к спектральной диффузии. Уменьшить влияние СД можно за счет увеличения длительности инвертирующего импульса с пропорциональным уменьшением его амплитуды. Если измеренное время T_1 не зависит от этой длительности, то влияние СД мало. Сказанное означает, что в работе сделаны оценки снизу для времен спин-решеточной релаксации радикалов, истинные времена T_1 могут быть длиннее. Такие оценки также имеют большую ценность, хотя и несколько меньшую, чем точные измерения. Замечу, что изучение механизмов парамагнитной релаксации радикалов в цели диссертации не входило.

По существу работы у меня есть следующие замечания:

Работа оформлена аккуратно, данные представлены в строгой логической последовательности и хорошо проиллюстрированы.

К недостаткам оформления диссертации можно отнести следующее:

1. На рис. 2.12 не указано, в каких единицах измеряется время.
2. В третьей главе имеется 2 рисунка с номером 3.10 (стр.77 и 82) и две таблицы с номером 3.5 (стр.78 и 82).
3. В подписях к рис. 3.9 и 3.11 упоминаются цвета линий, хотя рисунки черно-белые.
4. Расчетный спектр радикала SPE2 на рис. 3.11, где приведены 4 примера, не совпадает со спектром в Приложении В, где приведен полный набор для 12 радикалов. Расчетный спектр в приложении гораздо лучше аппроксимирует экспериментальный.

5. Структура "финляндского" тритильного радикала приведена трижды, на рис. 1.8, 1.10 и 4.1.

Указанные замечания, тем не менее, не снижают общую высокую оценку диссертации.

Автореферат и опубликованные статьи правильно и достаточно полно отражают содержание диссертации. Основные материалы диссертации опубликованы в виде 5-ти статей в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК. По данным Web of Science, эти работы процитированы к настоящему времени 35 раз. Результаты работы прошли апробацию в виде докладов на 11-ти конференциях, включая международные.

Считаю, что диссертационная работа *«Исследование магнитно-резонансных и функциональных свойств нитроксильных и тритильных радикалов»*, отвечает критериям п.9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013г., а ее автор, 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.

Официальный оппонент
Марьясов Александр Георгиевич
кандидат физико-математических наук,
старший научный сотрудник

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической кинетики и горения им. В.В.Воеводского
Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН)
630090, Россия, г.Новосибирск, ул.Институтская, д.3
Тел. 8(383)3331377,

Электронная почта: maryasov@kinetics.nsc.ru

09.12.2016

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

Подпись Марьясова А.Г. заверяю
Ученый секретарь ИХКГ СО РАН
д.ф.-м.н.



Н.А.Какуткина