

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ «МЕЖДУНАРОДНЫЙ ТОМОГРАФИЧЕСКИЙ ЦЕНТР»
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
МИНОБРНАУКИ РОССИИ

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 взрыв,
физика экстремальных состояний вещества

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель
д.ф.-м.н. Крумкачева Олеся Анатольевна

Новосибирск – 2025

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Актуальность темы работы	4
Степень разработанности темы исследования	5
Цель и задачи.....	6
Научная новизна работы	6
Теоретическая и практическая значимость работы	8
Методология и методы исследования	9
Положения, выносимые на защиту	10
Личный вклад автора	10
Апробация работы.....	11
Публикации.....	11
Степень достоверности результатов исследований.....	12
Объем и структура работы	12
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	14
1.1 ЭПР-спектроскопия триплетных состояний	14
1.1.1 Метод ЭПР-спектроскопии.....	14
1.1.2 Фотовозбужденное триплетное состояние молекул как новый класс спиновых меток	14
1.1.3 Спектр ЭПР фотовозбужденного триплетного состояния.....	18
1.1.4 Фотоиндуцированная импульсная дипольная спектроскопия	22
1.1.5 Импульсные последовательности динамической развязки	31
1.2 Фотодинамическая терапия рака	33
1.2.1 Принцип работы фотодинамической терапии	33
1.2.2 Молекулярные мишени для ФДТ	35
1.2.3 Фотосенсибилизаторы	38
1.3 Заключение	42
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ДИПОЛЬНОЙ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ G4-ДНК С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ	45
2.1 Введение.....	45
2.2 Экспериментальная часть.....	45
2.3 Результаты и обсуждение.....	48
2.3.1 Влияние спиновых меток на G-квадруплексы HТel-22	48
2.3.2 Структура G-квадруплекса HТel-22	50
2.3.3 Локализация ТМРyР4 в комплексе с HТel-22	53
2.3.4 Светоиндуцированные изменения структуры HТel-22	55

2.3.5 Димерные структуры HTel-22	59
2.4 Заключение	61
ГЛАВА 3. МЕТОДЫ ДИПОЛЬНОЙ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ С ФОТОВОЗБУЖДЕННЫМИ МЕТКАМИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ТЕТРАПИРРОЛЬНЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ.....	63
3.1 Введение.....	63
3.2 Экспериментальная часть.....	63
3.3 Результаты и обсуждение.....	64
3.3.1 Анионные порфирины.....	68
3.3.2 Нейтральные и катионные порфирины	72
3.4 Заключение	75
ГЛАВА 4. ПРИМЕНЕНИЕ ИМПУЛЬСНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДИНАМИЧЕСКОЙ РАЗВЯЗКИ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ МНОЖЕСТВЕННЫХ ЭХО-СИГНАЛОВ В ДИПОЛЬНОЙ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ С ФОТОВОЗБУЖДЕННЫМИ ТРИПЛЕТНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ	77
4.1 Введение.....	77
4.2 Экспериментальная часть.....	77
4.3 Результаты и обсуждение.....	81
4.3.1 Сравнение эффективности применения блоков динамической развязки	81
4.3.2 Применение блоков КПМГ к регистрации эходетектируемых спектров.....	87
4.3.3 Применение блоков КПМГ к экспериментам дипольной ЭПР-спектроскопии	88
4.3.4 Флуктуации мощности лазера как дополнительный источник шума	90
4.4 Заключение	94
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	96
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	98
БЛАГОДАРНОСТИ	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	101

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы работы

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 [1-3]. Высокоинформативным 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 [4-9]. Ключевой особенностью импульсного ЭПР является возможность исследовать структуры объектов, обладающих широким конформационным разнообразием [5, 10]. 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 [11, 12]. 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 [10, 13, 14]. Ключевое значение в этом процессе играет взаимодействие фотолигандов с биомолекулярными мишенями, 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 [15, 16, 17]. Человеческий сывороточный альбумин, обладая способностью нековалентно связываться с широким спектром лигандов через несколько сайтов разной специфичности, выступает как эффективный носитель для фотосенсибилизаторов [18]. 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 [3, 19]. 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, сосуществующих в образце, что идеально подходит для исследования объектов с полиморфизмом.

Степень разработанности темы исследования

До недавнего времени практически все исследования дипольной ЭПР спектроскопии проводились с использованием спиновых меток на основе стабильных радикалов [20, 21, 22]. С 2014 года начали появляться статьи, в том числе и работы, выполненные соискателем, демонстрирующие выполнение структурных исследований с использованием фотовозбужденных триплетных состояний молекул [4, 11, 12]. Ключевой особенностью таких фотоиндуцируемых меток является неравновесная поляризация электронных спинов, из-за чего интенсивность сигнала ЭПР триплетного состояния может существенно превышать сигнал стабильных радикалов [23]. Применение фотовозбужденного триплетного состояния как спиновой метки для детекции может значительно усилить наблюдаемые сигналы и сократить время накопления данных [12]. 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 [24]. 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 [4], что подчеркивает значимость и актуальность данного исследования.

Цель и задачи

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 TMRyP4 (мезо-тетра(N-метил-4-пиридил) 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 работы

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 TMRyP4 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 при концентрациях, приближенных к биологическим.

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 вблизи гем-сайта, наряду с дополнительными сайтами на поверхности белка. Для катионных порфиринов (C3Py и C5Py) 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 IB, вблизи Cys34.

Для экспериментов светоиндуцируемой дипольной ЭПР-спектроскопии впервые были продемонстрированы возможности, а также ограничения подхода, основанного на применении блоков динамической развязки. 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 развязки для фотовозбужденных триплетных состояний. Впервые продемонстрировано, что применение блоков динамической развязки позволяет сократить время накопления сигнала примерно в шесть раз по сравнению со стандартным методом при сохранении корректных распределений расстояний в экспериментах дипольной ЭПР-спектроскопии фотоиндуцированными метками. Кроме того, впервые определены условия для получения максимальной эффективности применения блоков динамической развязки 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 работы

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 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 методы позволяют изучать магнитные диполь-дипольные взаимодействия между спинами в нанометровом диапазоне расстояний. В результате обработки данных экспериментов дипольной ЭПР-спектроскопии 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 времяразрешенной 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 TMRyP4 (мезо-тетра(N-метил-4-пиридил)порфирин).

2. Структурная модель комплекса HTel-22/TMRyP4, 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 развязки 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 развязки, а также ограничения применимости предлагаемого метода, обусловленные флуктуациями мощности лазерного импульса.

Личный вклад автора

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. 5,15-ди(п-карбоксифенил)порфирин (DCPP), а также катионные пиридилзамещенные порфирины 5,10,15,20-тетракис(4-(4-пиридил-п-бутаноил)оксифенил)порфирин тетрабромид (C3Py) и 5,10,15,20-тетракис(4-(6-пиридил-п-гексаноил)оксифенил)порфирин тетрабромид (C5Py) были синтезированы лаборатории РТУ МИРЭА к.х.н. Ждановой К. А и д.х.н. Брагиной Н. А.

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).

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано четыре статьи в рецензируемых международных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации и индексируемых в системе Web of Science, Scopus и РИНЦ:

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.

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».

Степень достоверности результатов исследований

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.

Объем и структура работы

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.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 ЭПР-спектроскопия триплетных состояний

1.1.1 Метод ЭПР-спектроскопии

Структуры комплексов белков, ДНК с лигандами - это основные данные, необходимые для структурно-ориентированного дизайна лекарств [25]. Экспериментальные методы, такие как рентгеновская кристаллография, крио-ЭМ (криоэлектронная) и ЯМР (ядерный магнитный резонанс) спектроскопии, а также спектроскопия Ферстеровского переноса энергии могут предоставить детальную структурную информацию о комплексах биомолекул с лигандами [26, 27, 28]. Однако каждый из этих методов имеет ограничения, включая ограничения на размер системы, специальные требования к подготовке образцов, высокую стоимость и сложную обработку данных, что в некоторых случаях приводит к неоднозначным результатам [29, 30, 31].

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) — это высокочувствительный (в 1000 раз по сравнению с ЯМР спектроскопией) и информативный метод исследования молекул, обладающих ненулевым магнитным спином (S), в том числе триплетных состояний молекул со спином $S=1$ [32]. Метод ЭПР основан на взаимодействии электромагнитного излучения с магнитными моментами, создаваемыми электронами. На настоящий момент ЭПР-спектроскопия является ценным инструментом в структурной биологии [9, 33]. В отличие от рентгеновской кристаллографии, ЯМР или крио-ЭМ, она не может предоставить полные структуры с атомарным разрешением. Однако методы дипольной ЭПР-спектроскопии позволяют измерять распределения расстояний в диапазоне от 1.5 до 8 нм между присоединенными парамагнитными метками [34, 35]. Эти распределения дают информацию не только о наиболее термодинамически стабильных комплексах, но и о всех других конформациях, сосуществующих одновременно, поэтому дипольная ЭПР-спектроскопия предоставляет уникальную информацию о структурном разнообразии многокомпонентных комплексов, которая обычно недоступна для других методов [21, 36]. Эксперименты ЭПР могут проводиться независимо от общего размера исследуемых молекул при концентрациях, близких к биологически релевантным, в присутствии мембран и даже в клетках [37, 38, 39]. Распределения расстояний, полученные методами дипольной ЭПР-спектроскопии, визуализируют структурные изменения между комплексами и потенциально позволяют идентифицировать различные сайты связывания биомолекул для разных лигандов [6, 40].

1.1.2 Фотовозбужденное триплетное состояние молекул как новый класс спиновых меток

Почти все биологически важные системы являются диамагнитными и не дают сигнала ЭПР. Для проведения ЭПР исследований необходимо провести процедуру селективного

введения спиновых меток: в биологическую систему вводят в заданные положения специальные молекулы с ненулевым спином, называемые «спиновыми метками» [41, 42].

Характеристики спиновых меток, используемых в дипольной ЭПР-спектроскопии, играют ключевую роль, поскольку от них зависят чувствительность метода и пределы определяемых расстояний, поэтому поиск «идеальных» спиновых меток является активной областью исследований [21, 43, 44, 45, 46]. Под «идеальностью» меток подразумевается следующие желаемые спектроскопические свойства: интенсивный наблюдаемый ЭПР-сигнал, длительное время электронной спиновой фазовой релаксации вплоть до физиологических температур, высокая стабильность к восстановлению в клеточной среде. На данный момент существует широкий спектр спиновых меток, обладающих своими преимуществами и недостатками. Ключевой характеристикой спиновых меток является минимальная концентрация спиновых меток (исследуемых молекул для ЭПР-экспериментов), которая даст отношение сигнал/шум, достаточное для проведения измерений за разумное время, а также время фазовой памяти (T_m), которое определяет максимальное расстояние между спиновыми метками, которое можно измерить с помощью методов дипольной ЭПР-спектроскопии [43].

Наиболее часто используемыми спиновыми метками являются нитроксильные радикалы [47, 48]. Неспаренный электрон в таких радикалах делокализован на связи N-O: около 40% спиновой плотности приходится на атом азота и 60% спиновой плотности на атоме кислорода. Нитроксильные радикалы коммерчески доступны, крайне стабильны из-за стерической защиты связи N-O [49], имеют небольшие размеры и оказывают минимальные возмущения на структуру изучаемой биологической системы. Однако чувствительность методов дипольной ЭПР-спектроскопии при использовании нитроксильных меток часто оказывается недостаточной, и измерения расстояний при концентрациях меток ниже $\sim 10^{-5}$ М становятся практически невозможными. Это создает особые трудности при исследовании крупных биомолекул, склонных к агрегации (например, рибосом) при концентрациях 10^{-6} М или меньше.

Триарилметильные (ТАМ) радикалы являются углерод-центрированными спиновыми метками, в которых большая часть спиновой плотности (>60%) приходится на центральный атом углерода [35, 44]. ТАМ метки обладают рядом интересных спектроскопических свойств: микросекундное время фазовой памяти в широком диапазоне температур, узкий и интенсивный ЭПР-спектр, высокая химическая устойчивость в клеточных условиях [50, 51, 52]. Однако существенными недостатками таких меток являются длительный синтез, физический размер и гидрофобность.

В качестве спиновых меток также могут применяться ионы переходных металлов: Mn(II), Mo(V) или Fe(III) [53, 54, 55, 56]. Особое внимание уделяется иону меди Cu(II), на основе

которого были разработаны различные спиновые метки, демонстрирующие высокий потенциал для применения *in vivo* [38, 57, 58, 59]. Однако большая анизотропия g -тензора и/или СТВ-тензора приводит к широкому спектру ЭПР. Вследствие этого СВЧ импульсы могут возбудить лишь небольшую часть спектра, что существенно ограничивает наблюдаемый сигнал и глубину модуляции в двухчастотных экспериментах дипольной ЭПР-спектроскопии [60].

Недавно в качестве новой спиновой метки было предложено высокоспиновое состояние иона гадолиния Gd^{3+} [61]. Спектроскопические свойства Gd^{3+} , такие как относительно небольшое расщепление в нулевом поле и изотропный g -фактор, делают эту метку крайне привлекательной для использования на частотах спектрометра более 30 ГГц (W-диапазон). Использование спектрометра на столь высоких частотах приводит к уникальной чувствительности: требуемый объем образца уменьшается до 2-3 мкл [62]. Метки на основе Gd^{3+} более устойчивы к восстановлению или окислению, чем нитроксильные, что также позволяет их использовать в экспериментах *in vivo*.

Одним из прорывных достижений в ЭПР-спектроскопии является демонстрация того, что фотовозбужденное триплетное состояние порфиринов может быть использовано в качестве нового класса спиновых меток для экспериментов дипольной ЭПР-спектроскопии. Первая работа в этой области была проведена на основе модельного пептида, содержащей нитроксильный зонд и порфириновый мотив [11]. Многие биологически важные молекулы уже содержат в себе фотоактивный центр, позволяющий их использовать в роли фотоиндуцируемых меток для ЭПР-спектроскопии. Как правило, фотоактивный центр жестко зафиксирован в структуре родительской биомолекулы, что обеспечивает точные и узкие распределения расстояний между фотовозбужденным триплетным состоянием и нитроксильной меткой. Многочисленные работы, в которых в качестве фотоиндуцируемой метки использовалась простетическая группа, гем, продемонстрировали высокий потенциал такого подхода для экспериментов дипольной ЭПР-спектроскопии [63, 64, 65]. В дальнейшем в работе [66] было показано, что в качестве спиновых меток могут быть использованы коммерчески доступные флуоресцеиновые красители (эритрозин В, бенгальский розовый), поскольку они обладают высоким квантовым выходом триплетного состояния и являются водорастворимыми. В работе [4] впервые продемонстрирован потенциал светоиндуцированной ЭПР спектроскопии с использованием фотовозбужденного состояния ФС, перспективных в ФДТ. В работе [67] впервые был представлен подход селективного введения фотоиндуцированной метки в биологическую систему, позволяющую использовать методы светоиндуцированной дипольной ЭПР-спектроскопии для структурных исследований.

Рассмотрим переход под действием света фотоиндуцируемых спиновых меток в триплетное состояние более подробно (рисунок 1) [68, 69]. Для фотоиндуцированных меток характерно наличие сопряженных двойных связей, содержащих делокализованную систему π -электронов. В начальный момент времени молекула находится в основном синглетном состоянии (S_0), π -электроны находятся попарно (и антипараллельно друг другу) на орбиталях с наименьшей энергией. Поглощение фотона переводит молекулу в возбужденные синглетные состояния, для простоты ограничимся первым возбужденным состоянием S_1 . При возбуждении электрон на высшей занятой молекулярной орбитали состояния S_0 переходит на низшую незанятую молекулярную орбиталь S_1 . Далее может произойти возврат молекулы обратно в основное с эмиссией фотона ($S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$) (флуоресценция) или резонансный перенос возбуждения на соседнюю невозбужденную молекулу в результате диполь-дипольного взаимодействия (Ферстеровский перенос энергии). Кроме этого, молекула может также перейти и в триплетное состояние ($S_1 \rightarrow T_1$) через механизм интеркомбинационной конверсии (ИКК). Триплетное состояние молекулы имеет три подуровня и обладает более низкой энергией, чем возбужденное синглетное, но с более продолжительным временем жизни, поскольку переход в S_0 формально запрещен правилами квантовой механики, а запрет может быть частично снят благодаря спин-орбитальному взаимодействию. Вероятность перехода в возбужденное триплетное состояние при поглощении одного фотона называется квантовым выходом триплетного состояния. Важно отметить, фотовозбужденные триплетные состояния образуются с не больцмановской населенностью триплетных подуровней, а гиперполяризацией вследствие разной скорости ИКК из возбужденного синглетного состояния в различные подуровни триплетного состояния. Это приводит к увеличению интенсивности сигнала ЭПР по сравнению с сигналом от равновесной (больцмановской) поляризации спинов [11, 70, 71]. Помимо высокой интенсивности сигнала, использование фотоиндуцируемых спиновых меток позволяет проводить измерения как под действием света, так и в его отсутствии, таким образом контролировать «включение» спина-партнера в дипольном взаимодействии [24, 72]. Фотоиндуцируемые метки могут выступать как в роли спинов накачки, так и в роли спинов наблюдения в экспериментах дипольной ЭПР-спектроскопии, в обоих случаях обеспечивая существенные преимущества по сравнению с обычными (стабильными) парамагнитными метками.

Квантовый выход, а также ЭПР спектр триплетного состояния может измениться, если близко расположен стабильный радикал. Так, авторы работы [73] показали, что молекулярные конъюгаты, состоящие из фотоиндуцируемой метки с жестко присоединенным стабильным радикалом, обладают ЭПР-переходами, интенсивность которых чувствительна к величине обменного взаимодействия. В отсутствии радикала скорость ИКК в хромофоре обычно

обусловлена спин-орбитальным взаимодействием, тогда как в комплексе с радикалом оно также может быть индуцировано другими взаимодействиями и переходами [74]. Часто присутствие радикала приводит к большей скорости ИКК [75, 76]. Особенно наглядно данный эффект наблюдается с хромофором дипиррометенбор дифторид, который в свободном виде обладает низким выходом триплетного состояния, однако в диаде со стабильным нитроксильным радикалом демонстрирует высокий квантовый выход [77].

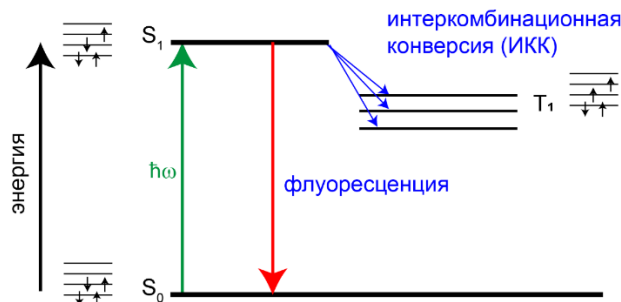


Рисунок 1. Диаграмма Яблонского возбуждения фотоиндуцируемых спиновых меток

Все перечисленные уникальные преимущества фотовозбужденного триплетного состояния как нового класса спиновых меток открывают новые возможности изучения структуры и функций биомолекул. Это включает в себя системы, используемые в фотодинамической терапии рака. Понимание закономерностей связывания фотолигандов с биомакромолекулами является ключевым этапом для создания безопасных, эффективных терапевтических агентов. Несмотря на высокий потенциал методик светоиндуцированной ЭПР-спектроскопии, к моменту начала работ по данной диссертации описанные методы не применялись для таких систем, что делает данное направление актуальным для исследования.

1.1.3 Спектр ЭПР фотовозбужденного триплетного состояния

Спиновые метки на основе фотовозбужденного триплетного состояния имеют ряд характерных особенностей в ЭПР-спектроскопии. В спектре фотовозбужденного триплетного состояния присутствуют как линии с излучением, так и с поглощением микроволновой мощности, а сам спектр намного шире, чем для стабильных нитроксильных или триарилметильных радикалов [11, 12].

Гамильтониан триплетного состояния в магнитном поле является суммой двух слагаемых: Зеемановского взаимодействия электрона с внешним магнитным полем и расщепления в нулевом поле (РНП). Последний вклад обусловлен анизотропным диполь-дипольным взаимодействием между двумя неспаренными электронами в триплетном состоянии, а также вкладом спин-орбитального взаимодействия, и может быть описан как:

$$\hat{H}_{\text{РНП}} = \hat{\mathbf{S}}^T \mathbf{D} \hat{\mathbf{S}} = D_X S_X^2 + D_Y S_Y^2 + D_Z S_Z^2, \quad (1)$$

где D_X , D_Y и D_Z - главные значения тензора РНП, диагонализированного в молекулярной системе координат. S_X , S_Y , S_Z — компоненты суммарного спина \mathbf{S} в молекулярной системе координат. Поскольку след тензора РНП \mathbf{D} равен нулю, это взаимодействие обычно задается с помощью двух параметров D и E , определяемых как:

$$D = \frac{3}{2}D_Z, \quad (2)$$

$$E = \frac{1}{2}(D_X - D_Y), \quad (3)$$

Таким образом, выражение (1) можно переписать в следующем виде:

$$\hat{H}_{\text{РНП}} = D \left(S_Z^2 - \frac{1}{3}S^2 \right) + E(S_X^2 - S_Y^2), \quad (4)$$

Принято определять D и E так, что $|D| > 3|E|$ и $|D_Z| \geq |D_X| \geq |D_Y|$ (ось Z тензора соответствует оси с максимальным по модулю значением дипольного взаимодействия) [78]. Параметры РНП зависят от структуры фотоиндуцированной метки и природы центрального металла [79, 80].

Полный гамильтониан с учетом Зеемановского взаимодействия при изотропном g -тензоре выражается как:

$$\hat{H} = g\mu_B(B_{0X}\hat{S}_X + B_{0Y}\hat{S}_Y + B_{0Z}\hat{S}_Z) + D \left(S_Z^2 - \frac{1}{3}S^2 \right) + E(S_X^2 - S_Y^2), \quad (5)$$

Одним из ключевых экспериментов в ЭПР-спектроскопии является регистрация спектра триплетного состояния методом времязрешенной ЭПР-спектроскопии. Данный метод основан на возбуждении молекул образца лазерным импульсом с последующей регистрацией временной эволюции сигнала намагниченности в постоянном магнитном поле. Спектр ЭПР триплетного состояния определяется не только параметрами РНП, но и относительными заселенностями этих подуровней.

Рассмотрим случай, когда величина внешнего магнитного поля $B_0 > \frac{D}{g\beta_e}$ (g -фактор электрона, μ_B - магнитон Бора), волновые функции триплетного состояния обозначим как $|T_{+1}\rangle$, $|T_0\rangle$, $|T_{-1}\rangle$. Если внешнее поле направлено вдоль одной из главных осей тензора РНП (каноническая ориентация), то энергия соответствующего состояния не зависит от величины \mathbf{B}_0 и задается только РНП взаимодействием, в то время как энергии двух остальных состояний возрастают и убывают. Например, если \mathbf{B}_0 направлено вдоль оси Z , то уровни энергии определяются собственными значениями матрицы:

$$H = \begin{pmatrix} -D_X & -ig\beta_e B_0 & 0 \\ ig\beta_e B_0 & -D_Y & 0 \\ 0 & 0 & -D_Z \end{pmatrix}, \quad (6)$$

Положения уровней энергии системы описываются следующим образом:

$$\varepsilon_0 = -\frac{2}{3}D, \quad (7)$$

$$\varepsilon_{+1,-1} = \frac{1}{3}D \pm \sqrt{E^2 + g^2\beta_e^2 B_0^2}, \quad (8)$$

Для определенности будем считать, что $D > 0$, $E < 0$. В ЭПР-спектре будут видны два перехода с энергиями:

$$\varepsilon_{Z+} = \varepsilon_{+1} - \varepsilon_0 = D + \sqrt{E^2 + g^2\beta_e^2 B_0^2}, \quad (9)$$

$$\varepsilon_{Z-} = \varepsilon_0 - \varepsilon_{-1} = -D + \sqrt{E^2 + g^2\beta_e^2 B_0^2}, \quad (10)$$

Расщепление между линиями определяется как:

$$\varepsilon_{Z+} - \varepsilon_{Z-} = 2D, \quad (11)$$

Аналогично проводится расчет уровней энергий, когда \mathbf{B}_0 направлено вдоль осей X, Y. Значения расщеплений между линиями для этих ориентаций показано на рисунке 2.

При большом значении магнитного поля в соответствии с правилами отбора разрешены переходы с $\Delta M_s = \pm 1$, то есть только между T_0 и T_{+1} или T_{-1} . В зависимости от того, между какими состояниями происходит переход (например, если $\mathbf{B}_0 \parallel Y$, $T_0 \rightarrow T_{+1}$ или $T_0 \rightarrow T_{-1}$) линии ЭПР обозначают Y^+ или Y^- соответственно. Исходя из энергий переходов, параметр D можно оценить по максимальному расщеплению между линиями спектра, а параметр E из любого другого расщепления. Для более точных расчетов требуется моделирование спектров [81].

В слабых магнитных полях присутствует линия разрешенного перехода с $\Delta M_s = 2$, наблюдаемая при половине магнитного поля по сравнению с линиями X, Y, Z [82]. Резонансное поле, а также форма линии перехода $\Delta M_s = 2$ содержит важную информацию о параметрах расщепления в нулевом поле исследуемой спиновой системы [83].

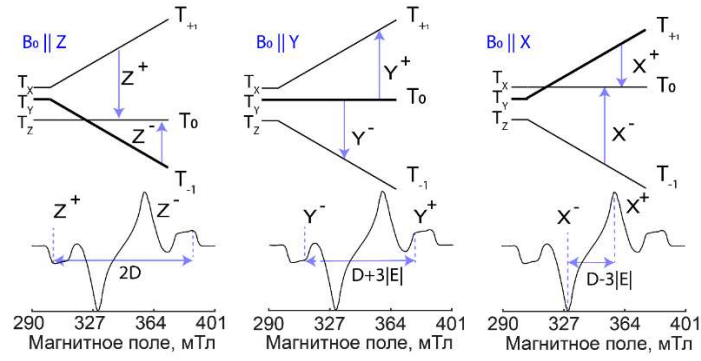


Рисунок 2. Энергии подуровней триплетного состояния как функция внешнего магнитного поля с вектором поля, направленного вдоль осей дипольного взаимодействия соответственно. Когда энергия микроволнового излучения соответствует энергетическому зазору между T_0 и T_+ или T_- , происходит дипольный переход. Переходы, соответствующие каноническим ориентациям магнитного поля, соответствуют поворотным точкам спектра ЭПР. Для примера приведен спектр для триплетного состояния мономера водорастворимого порфирина ТМРур4 (заселен в основном подуровень при ориентации поля вдоль молекулярной оси Y , выделен жирной линией) [79]. Переходы могут происходить как с излучением мощности (отрицательная амплитуда сигнала), так и с поглощением (положительная амплитуда сигнала) в зависимости от относительной заселенности подуровней.

По аналогии с классическим диполь-дипольным взаимодействием, а параметры РНП могут быть записаны как [84]:

$$D = -D_{dip} \left\langle \frac{3Z^2 - r^2}{r^5} \right\rangle \quad (12)$$

$$E = -D_{dip} \left\langle \frac{X^2 - Y^2}{r^5} \right\rangle, \quad (13)$$

где D_{dip} - константа диполь-дипольного взаимодействия, r - расстояние между двумя неспаренными электронами, а угловые скобки обозначают усреднение по пространству.

Приведенные уравнения (12), (13) демонстрируют связь параметра D со средним расстоянием между электронами, тогда как параметр E содержит информацию о ромбичности РНП-тензора [85]. Для систем с осевой симметрией $E = 0$, E отлично от нуля для систем с более низкой симметрией. Отношение $|E/D|$ является мерой аксиальности РНП-тензора, где большие значения $|E|$ указывают на сильную неаксиальность распределения неспаренных электронов [86]. В рамках приближения точечных диполей пропорциональность значения D величине $\langle r^{-3} \rangle$ может быть использована для определения масштаба делокализации триплетного состояния. Однако использование такого приближения для оценки может привести к неправильному значению масштаба при наличии значительной делокализации, например, как в

случае наличия π -сопряжения [87]. Для более корректных расчетов требуется характеристика распределения спиновой плотности с использованием ЭПР-методов для определения величины сверхтонкого взаимодействия с магнитными ядрами в молекуле, а также теоретических расчетов с помощью современных методов квантовой химии [88].

1.1.4 Фотоиндуцированная импульсная дипольная спектроскопия

Импульсная дипольная ЭПР-спектроскопия объединяет серию импульсных методов ЭПР, с помощью которых возможно получать расстояния между двумя парамагнитными центрами в диапазоне от 1.5 до 8 нм (в некоторых случаях верхний предел удастся сдвинуть до 14-16 нм при замене всех атомов водорода на атомы дейтерия образца и растворителя) [34, 89]. Ключевой особенностью импульсной дипольной ЭПР-спектроскопии является возможность получать не только информацию о среднем расстоянии между спиновыми метками, а воспроизводить точное распределение расстояний [9, 90, 91, 92]. Именно благодаря этой характерной особенности ЭПР-спектроскопия активно применяется для отслеживания структурных переходов, а также для систем с множеством конформаций [93, 94].

Необходимым условием проведения всех импульсных экспериментов дипольной ЭПР-спектроскопии является иммобилизация исследуемых спин-меченых биомолекул, так как их вращение приводит к усреднению диполь-дипольного взаимодействия до нуля. Иммобилизация может быть достигнута либо проведением экспериментов при низких температурах в замороженных растворах, либо с помощью присоединения через ковалентную связь к твердому носителю, электростатическим взаимодействием с силикагелем, а также использованием в качестве матрицы растворителя сахаридов [95, 96, 97].

В основе импульсной дипольной спектроскопии лежит измерение диполь-дипольного взаимодействия между двумя парамагнитными центрами. Энергию диполь-дипольного взаимодействия можно записать как:

$$E = \frac{\mu_A \mu_B}{r^3} - \frac{3(\mu_A r)(\mu_B r)}{r^5}, \quad (14)$$

где r - расстояние между спинами А и В.

Соотношение между магнитным моментом электрона и оператором спина электрона $\mathbf{S} = (S_x, S_y, S_z)$ выражается как:

$$\boldsymbol{\mu} = -\gamma_e \hbar \mathbf{S}, \quad (15)$$

где γ_e -гиромагнитное отношение для электрона, а \hbar -постоянная Планка.

Подставив выражение для магнитного момента (15) в уравнение (14), можно записать дипольный гамильтониан H_{dip} следующим образом [98]:

$$H_{dip} = \frac{g_A g_B \mu_B^2}{r^3} (A + B + C + D + E + F), \quad (16)$$

где g_A, g_B – изотропные значения g -тензоров спинов А и В, члены $A – F$ представлены в виде произведения спиновых операторов в сферических координатах r, θ и φ , описывающих ориентацию вектора, соединяющего спины, относительно внешнего магнитного поля:

$$A = S_z^A S_z^B (1 - 3\cos^2 \theta), \quad (17)$$

$$B = -\frac{1}{4} (S_+^A S_-^B + S_-^A S_+^B) (1 - 3\cos^2 \theta), \quad (18)$$

$$C = -\frac{3}{2} (S_+^A S_z^B + S_z^A S_+^B) \sin\theta \cos\theta e^{-i\varphi}, \quad (19)$$

$$D = -\frac{3}{2} (S_-^A S_z^B + S_z^A S_-^B) \sin\theta \cos\theta e^{i\varphi}, \quad (20)$$

$$E = -\frac{3}{4} S_+^A S_+^B \sin^2 \theta e^{-2i\varphi}, \quad (21)$$

$$F = -\frac{3}{4} S_-^A S_-^B \sin^2 \theta e^{2i\varphi}, \quad (22)$$

В слагаемые $A – F$ введены повышающие и понижающие операторы S_+^A и S_-^A для спина А, S_+^B и S_-^B для спина В. Выражения (16–22) справедливы только когда уширение линий спектра из-за анизотропии g -тензора мало по сравнению с РНП. В случае сильной анизотропии g -тензора количество слагаемых в выражении 16 увеличивается до 9-ти [99].

Если дипольное взаимодействие мало по сравнению с зеемановским расщеплением, то дипольное расщепление в основном определяется первым слагаемым - секулярным членом А. Тогда выражение (16) можно переписать как:

$$H_{dip} = \omega_{dip} (S_z^A S_z^B), \quad (23)$$

В уравнении (23) дипольная частота ω_{dip} задается следующим образом:

$$\omega_{dip} = \frac{g_A g_B \mu_B^2}{r^3} (1 - 3\cos^2 \theta), \quad (24)$$

Обычно при использовании уравнения (24) подразумевается приближение точечных диполей, т.е. спины электронов достаточно далеки друг от друга, чтобы их распределение (например, по $p – \pi$ орбиталям нитроксильного радикала) не имело значения [100]. Для нитроксильных

радикалов приближение точечных диполей справедливо в доступном для дипольной ЭПР-спектроскопии диапазоне измеряемых расстояний между метками ($r > 15 \text{ \AA}$) [101].

Полный спектр состоит из суммы всех вкладов от всех возможных ориентаций молекул-бирадикалов относительно магнитного поля. В замороженном растворе все пары радикалов ориентированы хаотично, поэтому нужно суммировать вклады в спектр от всех ориентаций в выражении (24) при фиксированном расстоянии между спинами r . Спектр системы полиориентированных бирадикалов имеет форму пейковского дублета (рисунок 3). Он имеет характерные интенсивные пики, соответствующие перпендикулярной ориентации соединяющего спины вектора относительно направления внешнего магнитного поля $\theta = 90^\circ$, а также низкоинтенсивные края, обусловленные параллельной ориентацией $\theta = 0^\circ$.

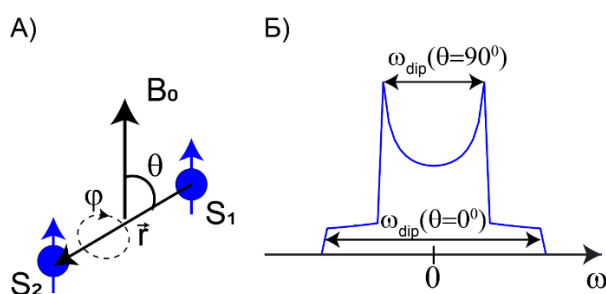


Рисунок 3. А) Пара электронных спинов S_1 и S_2 , связанных диполь-дипольным взаимодействием. Вектор r , соединяющий спины, направлен вдоль оси Z в молекулярной системе координат. В этой системе направление внешнего магнитного поля B_0 определяется углами θ и φ . Б) Пейковский дублет. На спектре указаны величины расщепления для перпендикулярной и параллельной ориентаций.

Импульсные последовательности дипольной ЭПР-спектроскопии, использованные в диссертационной работе, представлены на рисунке 4. Во всех экспериментах для получения сигнала дипольных осцилляций регистрируется интегральная интенсивность спинового эха в зависимости от положения импульса накачки или лазерного импульса. Каждый метод дипольной ЭПР-спектроскопии обладает своими особенностями, которые важно учитывать для корректной обработки данных.

Одним из наиболее распространенных экспериментов импульсной дипольной ЭПР-спектроскопии является эксперимент ДЭЭР (двойной электрон-электронный резонанс), который обычно применяется для исследования диполь-дипольного взаимодействия между стабильными спиновыми метками [37, 102, 103]. В этом эксперименте используются две частоты ω_A и ω_B , которые соответствуют двум разным наборам спинов. Для частоты наблюдения ω_A применяется модифицированная последовательность Хановского эха $\frac{\pi}{2} - \tau - \pi$ с дополнительным

рефокусирующим π импульсом. В ходе эксперимента при приложении π импульса на частоте накачки изменяется проекция спинов В, из-за чего происходит эволюция поляризации спинов А под действием диполь-дипольного взаимодействия. Метод ДЭЭР продемонстрировал высокую информативность в структурных исследованиях модельных пептидов, белков и даже конформационных переходов РНК в клетках [104, 105, 106, 107].

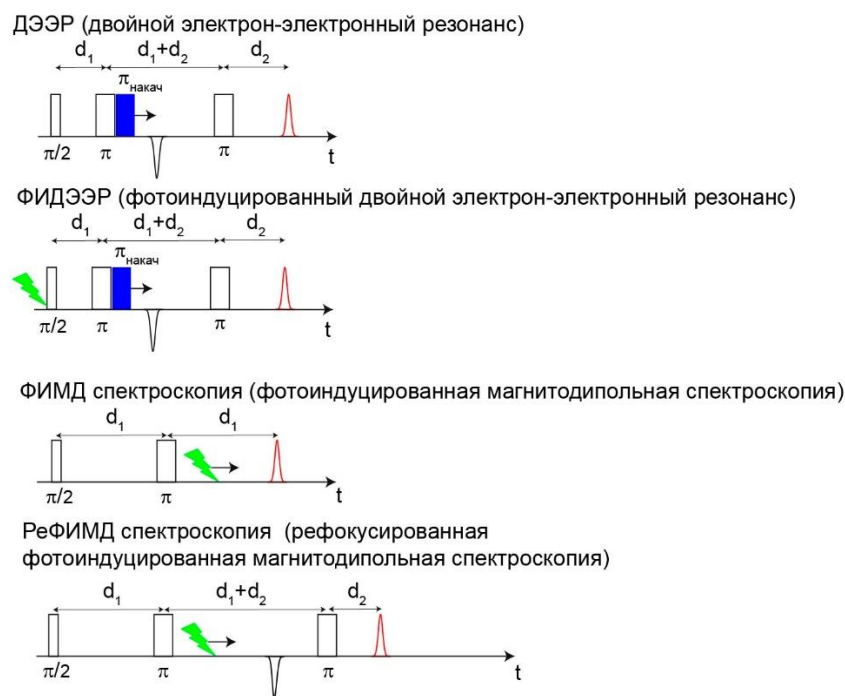


Рисунок 4. Схема последовательностей СВЧ импульсов основных экспериментов дипольной спектроскопии. В экспериментах ДЭЭР, ФИМД и РеФИМД спином наблюдения является стабильная метка. В экспериментах ДЭЭР, ФИДЭЭР спином накачки является стабильная спиновая метка, в экспериментах ФИМД, РеФИМД в роли импульса накачки используется лазерный импульс, который переводит фотоиндуцируемую метку в возбужденное триплетное состояние.

Рассмотрим форму сигнала в эксперименте ДЭЭР более подробно. Прежде всего, введем несколько дополнительных допущений: обменной связью между спинами электронов можно пренебречь, ось квантования обоих спинов направлена вдоль внешнего магнитного поля, а также для каждого спина А спины В, расположенные в других молекулах, распределены однородно в пространстве. Учитывая эти допущения, результирующий сигнал спинового эха как функцию от времени t можно записать как [108]:

$$V(t) = V_0 \{1 - \lambda(1 - F(t))\} B(t), \quad (25)$$

где коэффициент V_0 соответствует амплитуде сигнала в отсутствии импульса накачки (или в нулевой момент времени), $B(t)$ описывает базовую линию (спад спинового эха вследствие

влияния пар спинов вне кластера), параметр λ называют глубиной модуляции, функцию $F(t)$ называют форм-фактором.

Форм-фактор $F(t)$ можно выразить через интегральное уравнение Фредгольма первого рода, где $K(r, t)$ – его ядро, которое характеризует сигнал от пары спинов на расстоянии r при приложении импульса накачки в положении времени t :

$$F(t) = \int_{R_{\min}}^{R_{\max}} K(r, t) P(r) dr, \quad (26)$$

$$K(r, t) = \int_0^{\pi} \cos\left(\frac{D_{dip}}{r^3} (1 - 3\cos^2\theta)t\right) \sin\theta d\theta, \quad (27)$$

Вычисление функции распределения по расстояниям $P(r)$ из $F(t)$ является некорректно поставленной обратной задачей, так как малое изменение $F(t)$ вследствие шума или небольших ошибок в определении базовой линии приводит к значительным изменениям $P(r)$. Устойчивое к шумам решение можно найти, требуя определенной степени гладкости распределения. Это может быть достигнуто путем минимизации функционала:

$$G_{\alpha}(P) = ||KP - F||^2 + \alpha \left\| \frac{d^2 P}{dr^2} \right\|, \quad (28)$$

где α – параметр регуляризации, который взвешивает критерий гладкости $\eta = \left\| \frac{d^2 P}{dr^2} \right\|$ по отношению к критерию минимального среднеквадратичного отклонения $\rho = ||KP - F||^2$. Данный подход называется методом регуляризации Тихонова [109].

Для выбора параметра регуляризации α строится логарифмический график зависимости гладкости от среднеквадратичного отклонения, называемый L-кривой из-за характерного вида (рисунок 5).

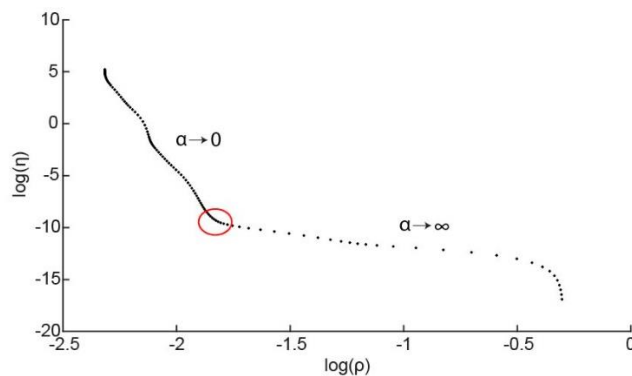


Рисунок 5. Характерный вид L-кривой. Красным обозначена точка оптимального значения α .

L-кривую можно разбить на две области: область недосглаживания ($\alpha \rightarrow 0$), когда в итоговом решении присутствует много узких пиков, интенсивность и положения которых сильно зависят от шума, и область пересглаживания ($\alpha \rightarrow \infty$), соответствующая уширенному

распределению, приводящему к большим ошибкам. Точка перехода между областями соответствует оптимальному значению α .

В качестве альтернативного способа обработки дипольных временных зависимостей была разработана нейронная сеть DEERNet [110]. DEERNet решает интегральное уравнение Фредгольма второго рода в матричном виде. В сложных случаях, когда точку перегиба L-кривой определить достаточно сложно, то есть в распределении расстояний одновременно присутствуют узкие и широкие пики, рекомендуется использовать именно подход с использованием нейросетей, а не регуляризации Тихонова [110]. Пример получения функции распределения по расстояниям из временных зависимостей методом DEERNet представлен на рисунке 6.

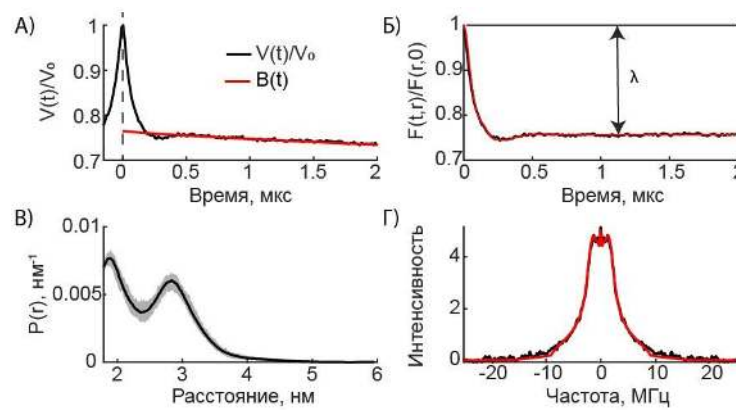


Рисунок 6. Пример получения функции распределения по расстояниям из экспериментальных временных зависимостей. А) Временная зависимость дипольных осцилляций $V(t)$ и соответствующая аппроксимация базовой линии $B(t)$, полученная методом DEERNet Б) Временная зависимость дипольных осцилляций после корректировки базовой линии (черная линия) и функция форм-фактора $F(t)$. На рисунке также показана величина параметра глубины модуляции λ . В) Соответствующее распределение расстояний $P(r)$, серым цветом указаны границы ошибок в определении $P(r)$. Г) Фурье-спектр функции $F(t, r)$ (черная линия) и результат его моделирования (красная линия)

В случаях, когда в спектре исследуемой системы присутствует анизотропия, и спектральная ширина возбуждения микроволновыми импульсами мала по сравнению со спектральной шириной линий, в регистрируемых временных зависимостях присутствует эффект ориентационной селективности: форма распределения по расстояниям зависит от положения импульсов наблюдения и накачки. Данный эффект появляется из-за того, что только ограниченное число ориентаций спинов относительно приложенного магнитного поля вносят вклад в дипольную частоту и наиболее выражен при использовании жестко связанных спиновых

центров, когда ЭПР-спектры демонстрируют хорошо разрешенную анизотропию, например, g-тензора [111, 112, 113].

Последовательность ФИДЭЭР (фотоиндуцированный двойной электрон-электронный резонанс) стала первой последовательностью для определения расстояния между фотовозбужденным триплетным состоянием молекулы и стабильным радикалом [11]. Использование фотовозбужденного триплетного состояния в качестве спина для наблюдения способно повысить отношение сигнал-шум регистрируемых временных зависимостей благодаря гиперполяризации триплетного состояния [12]. Максимальное доступное для измерений расстояние зависит от времени фазовой релаксации триплетного состояния [43]. Глубина модуляции в полученных данных определяется эффективностью переворота импульсом накачки, и ее можно улучшить, используя адиабатические импульсы [24, 114].

Для триплетных состояний молекул взаимодействие РНП является важным параметром, который может изменять форму временных зависимостей [115], [116]. Триплетная спиновая система не может рассматриваться в только секулярном приближении в уравнении (16). Дипольные частоты также зависят от величины параметров РНП и зеемановской частоты. Для ФИДЭЭР этот эффект можно подавить, используя молекулы, РНП триплетных состояний которых мало по сравнению с расщеплением Зеемана. Для ФИМД спектроскопии РНП практически не влияет на дипольные осцилляции с переносом когерентности с $\Delta m_T = \pm 1$, но ускоряет спад временной дипольной зависимости. Это ускорение вызвано третьим путем переноса когерентности с $\Delta m_T = 0$, вероятность которого в первую очередь зависит от отношения РНП к зеемановской частоте, а также от расстояния между фотоиндуцированной и стабильной спиновыми метками. Для фотоиндуцированных меток с параметрами $D \approx 1$ ГГц игнорирование РНП в Q-диапазоне не влияет на получаемые распределения расстояний, тогда как в X-диапазоне игнорирование РНП может дополнительно привести к артефактным пикам в распределении расстояний.

Несмотря на то, что фотоиндуцированные метки обладают значительной степенью делокализации триплетного состояния, приближение точечных диполей остается справедливым [65]. Кроме того, аналитическое выражение для модуляции эха, обусловленной диполь-дипольным взаимодействием парамагнитного центра с $S=1$ с центром $S=1/2$, демонстрирует зависимость от дипольной частоты, аналогичную таковой для стандартного случая $S=1/2-S=1/2$, что позволяет использовать для анализа данных стандартные методы в случаях, когда в роли спинов накачки в ФИДЭЭР выступают нитроксильные радикалы [117].

Относительно новым экспериментов в дипольной ЭПР-спектроскопии является метод ФИМД (фотоиндуцированная магнитодипольная) спектроскопия, в которой фотовозбужденные

триплетные состояния играют роль спинов типа В в экспериментах ДЭЭР [72]. Вместо переворота спина импульсом накачки в ФИМД спектроскопии происходит возбуждение триплетного состояния спина партнера после лазерного импульса, что приводит к появлению дипольного взаимодействия. Однако, в отличие от 3-импульсного ДЭЭР, в котором точка нулевого времени может быть скрыта артефактами из-за спектрального пересечения микроволновых импульсов (проблема мертвого времени) [118], в ФИМД спектроскопии этого не происходит, поскольку лазерный импульс не является микроволновым импульсом. Следовательно, в этом эксперименте нет мертвого времени, и точное определение нулевого времени зависит исключительно от того, насколько точно можно сделать получаемую временную зависимость симметричной. Это, в свою очередь, зависит от возможности записи полной зависимости с хорошим соотношением сигнал/шум. Асимметрия временной зависимости является результатом различных фоновых вкладов, например, эффектом нагрева лазера при начале работы, а также вкладом сигнала эха Хана фотовозбужденного триплетного состояния в момент первого СВЧ импульса. Глубину модуляции λ в эксперименте ФИМД можно выразить как:

$$\lambda = \varphi_T(p_{-1} + p_{+1}), \quad (29)$$

где φ_T – квантовый выход триплетного состояния, p_{-1} , p_{+1} – населенность соответствующих триплетных подуровней.

Дополнительный π импульс в эксперименте РеФИМД (рефокусированной фотоиндуцированной магнитодипольной) спектроскопии позволяет обойти проблему некорректного определения нулевой точки, что особенно влияет на распределения коротких расстояний [64]. Однако это может приводить к более слабым сигналам по сравнению с ФИМД спектроскопией из-за эффекта спин-спиновой релаксации и неидеальности микроволновых импульсов. Метод РеФИМД спектроскопии важен для систем с малыми расстояниями между спиновыми метками, где требуется лишь запись сигнала в небольшом временном диапазоне для регистрации частоты дипольных осцилляций, а точное определение нулевого времени критически важно для корректного анализа.

Эксперименты ФИМД спектроскопии демонстрируют большую глубину модуляции по сравнению с классическими экспериментами ФИДЭЭР с прямоугольными микроволновыми импульсами, так как из-за широкого спектра триплетного состояния импульсами возбуждается только малая часть спинов, что приводит к малой глубине модуляции в регистрируемых временных зависимостях в эксперименте ФИДЭЭР, в то время как лазерный импульс в экспериментах ФИМД спектроскопии спектрально неограничен [24]. ФИМД спектроскопия также позволяет детектировать все сайты локализации фотоактивных лигандов без проблемы

ориентационной селективности по импульсу накачки [24]. Было показано, что вклады путей переноса когерентности с $\Delta m_s = \pm 1$ одинаковы, и для получения функции распределения по расстояниям можно использовать те же походы, что и для ДЭЭР [67].

Однако и ФИДЭЭР, и ФИМД спектроскопия обладают особенностями, которые важно учитывать для корректной постановки эксперимента и интерпретации полученных распределений. В экспериментах ФИДЭЭР при использования импульса накачки из-за его нерезонансного воздействия на спины А в сигнале проявляется динамический сдвиг фазы, который отсутствует в экспериментах ФИМД спектроскопии [119]. В то время как для экспериментов ФИДЭЭР чувствительность возрастает из-за спиновой гиперполяризации (неравновесной поляризации) триплетного состояния, это свойство триплетного состояния не влияет на наблюдаемый сигнал в ФИМД спектроскопии. Кроме того, метод ФИМД спектроскопии демонстрирует меньшую глубину модуляции из-за отсутствия вклада уровня $\Delta m_s = 0$ в дипольное взаимодействие (РНП мало по сравнению с зеемановским взаимодействием) [67]. Однако использование ФИМД спектроскопии имеет другие преимущества [63, 120]:

1. Лазерный импульс возбуждает фотоиндуцируемые метки во всех возможных ориентациях относительно внешнего магнитного поля, то есть обладает бесконечной спектральной шириной возбуждения. Это соответствует возбуждению всего ЭПР-спектра триплетного состояния, что исключает ориентационную селективность для спина накачки и потенциально способно увеличивать глубину модуляции.

2. ФИМД спектроскопия является одночастотным методом, то есть не требует использование микроволновых импульсов на другой частоте. Благодаря этому можно повысить добротность резонатора, что позволяет использовать более высокую мощность микроволнового излучения, сократить длительность импульсов и повысить чувствительность эксперимента.

3. Нижний предел расстояний, доступных для измерения методом ФИДЭЭР (примерно 1.5 нм), обусловлен конечной спектральной шириной возбуждения микроволновыми импульсами. В ФИМД спектроскопии минимальное определяемое расстояние зависит только от длительности наблюдающих импульсов, что позволяет измерять более короткие расстояния.

4. В ФИМД спектроскопии наблюдение можно проводить на максимуме эходетектируемого спектра стабильной метки без потери глубины модуляции, что также повышает чувствительность метода.

Таким образом, методы ФИМД спектроскопии и ФИДЭЭР дополняют друг друга и, а их использование зависит от конкретных условий и целей эксперимента. В работе [121] впервые

показана возможность комплексного использования РеФИМД спектроскопии и ФИДЭЭР, что позволяет получать геометрическую структурную информацию об исследуемой системе на атомарном уровне, используя взаимодополняющую информацию от обоих методов.

1.1.5 Импульсные последовательности динамической развязки

Применение спиновых меток, получаемых через фотовозбуждение в триплетное состояние, имеет несомненные достоинства, однако на практике исследователи сталкиваются с серьезными барьерами. Эти трудности вызваны как аппаратными ограничениями лазерной техники, так и фотофизикой самих молекул. В то время как эксперименты со стабильными радикалами (например, нитроксильными) рутинно проводятся на частотах повторения около 200 Гц [36], рабочая частота большинства лазерных установок не превышает 10–20 Гц [11, 12, 67, 72], лишь в некоторых случаях поднимаясь до 50–100 Гц. Использование более быстрых лазеров (>100 Гц) с необходимой мощностью импульса (1–10 мДж) и длительностью (10–20 нс) затруднено из-за их редкости и риска повреждения оптических компонентов [24, 122].

Кроме того, фактором, лимитирующим скорость эксперимента, является сама природа триплетных состояний, так как при криогенных температурах они обладают длительными временами жизни и спин-решеточной релаксации [43]. Стоит отметить, что высокая спиновая поляризация триплетов способна компенсировать низкую частоту повторов, иногда обеспечивая даже лучшую чувствительность (соотношение сигнал/шум во времени), чем у стабильных радикалов [11, 12]. Тем не менее, зачастую именно низкая скорость накопления данных снижает общую эффективность метода. В связи с этим ключевой задачей становится поиск новых методических и технических решений, позволяющих максимизировать амплитуду сигнала в условиях вынужденно низкой частоты повторения импульсов.

В большинстве импульсных ЭПР-экспериментов регистрируемым сигналом является электронное спиновое эхо (ЭСЭ). Традиционно используется либо интегрирование ЭСЭ в определенном временном окне, либо регистрация амплитуды эха в точке максимума при варьировании параметров последовательности (длительностей и положений импульсов, дополнительных сверхвысоких или радиочастотных импульсов, внешнего магнитного поля и т. д.). Однако ЭСЭ может быть рефокусировано несколько раз с помощью дополнительных 180° -импульсов, что позволяет интегрировать несколько рефокусированных эх вместе с основным, значительно повышая чувствительность эксперимента. Этот подход основан на применении схем динамической развязки, предназначенных для подавления потери сигнала между π -импульсами [123, 124, 125, 126]. Наиболее известной в магнитном резонансе является последовательность Карра-Парселла-Мейбума-Гилл (КПМГ), десятилетиями используемая в ЯМР [127, 128, 129, 130]. В импульсной ЭПР-спектроскопии эта методика была впервые

предложена Элявом и Фридом [131]. Авторы работы [100] применили блок из нескольких $\pi/2$ -импульсов в ДЭЭР для сохранения намагниченности вдоль оси z с последующим ее восстановлением между импульсами, что повысило чувствительность примерно в 2 раза. В другой работе [132] авторы провели масштабное исследование применения КПМГ блоков в различных последовательностях ЭПР. В зависимости от парамагнитного центра и типа последовательности интегрирование множества эх позволило улучшить отношение сигнал/шум в 1.6–5 раз. Последовательности динамической развязки с детектированием одного (конечного) ЭСЭ также успешно применялись в других методах дипольной ЭПР-спектроскопии для расширения диапазона измеряемых расстояний [89, 133, 134].

Как спектроскопический метод, схемы динамической развязки недавно были использованы в работах [135, 136] для характеристики спинового окружения электрона. Эти исследования значительно углубили понимание механизмов потери когерентности в импульсной ЭПР-спектроскопии и условий эффективного применения КПМГ блоков. Так, было показано, что множественная рефокусировка наиболее эффективна для подавления механизма ядерной спиновой диффузии. В работе [137] было показано, что процесс потери когеренции электронных спинов, индуцированный ядерной спиновой средой, может успешно описываться с помощью анализа модуляции огибающей эха.

В большинстве исследований авторы сосредотачивались на применении блоков динамической развязки к системам с $S = 1/2$; только две работы затрагивали системы со спином $S > 1/2$. Комплекс $\text{Mn}^{2+}:\text{АТР}$ ($S = 5/2$) использовался для оценки эффективности применения КПМГ в ДЭЯР (двойной электрон-ядерный резонанс) экспериментах [132]. Однако в данной работе изучалось только переходы между состояниями с проекциями спина $-1/2$ и $1/2$, в то время как расщепление в нулевом поле — ключевая характеристика высокоспиновых систем — вносило в этот переход лишь вклад второго порядка. Недавнее исследование комплексов Gd^{3+} ($S = 7/2$) показало, что путь переноса когерентности, связанный с РНП, вносит вклад в декогеренцию и не подавляется методами динамического управления когеренцией [135]. Однако экспериментальное изучение эффекта для триплетных состояний молекул до сих пор не проводилось.

Основываясь на описанных выше результатах, можно предположить, что схема КПМГ будет работать для фотовозбужденных триплетных состояний молекул хуже, чем для нитроксильных радикалов. Однако даже умеренное увеличение чувствительности за счет интегрирования множества эх может оказаться полезным, поскольку позволяет компенсировать низкую частоту повторения лазерных импульсов практически «бесплатно» — без ускорения

скорости повторения лазерных импульсов или потери интенсивности сигнала за счет работы при повышенных температурах для сокращения времени продольной релаксации.

1.2 Фотодинамическая терапия рака

1.2.1 Принцип работы фотодинамической терапии

Идея использования в качестве спиновой метки фотовозбужденного триплетного состояния открывает новые перспективы для изучения структуры комплексов биомолекул, связанных с фотоактивными лигандами [4]. Это направление особенно актуально для систем, используемых в фотодинамической терапии (ФДТ). ФДТ - это метод лечения рака, основанный на использовании фотосенсибилизатора (ФС), молекулы, которая сама по себе не токсична, но под воздействием света и в присутствии молекул кислорода может генерировать активные формы кислорода, вызывая повреждение белков, нуклеиновых кислот, липидов, мембран и органелл, и, как следствие, индуцировать гибель клеток [14, 138]. ФДТ имеет ряд преимуществ перед традиционными методами лечения: неинвазивность, высокая селективность терапии, отсутствие осложнений, возникающих при хирургическом вмешательстве, и минимизация побочных эффектов, характерных для химиотерапии и радиотерапии [139, 140]. Использование ФДТ не требует длительного стационарного лечения или дорогостоящих препаратов, благодаря чему является экономически выгодным [141]. На данный момент многочисленные обзоры подчеркивают высокую эффективность ФДТ в лечении широкого спектра онкологических заболеваний: рака пищевода, легких, простаты, яичников, головы/шеи [142, 143, 144, 145, 146]. Сочетание ФДТ с традиционными методами лечения приводит к повышению эффективности терапии из-за преодоления недостатков одного метода за счет преимуществ другого [147].

Механизм действия ФДТ состоит из нескольких этапов. На первом этапе под воздействием облучения ФС переходит из основного синглетного состояния в возбужденное триплетное. Далее, возбужденный электрон в триплетном состоянии ФС может изменить ориентацию спина и вернуться на начальную орбиталь с испусканием фотона (фосфоресценция). Однако возможен и другой сценарий: ФС в триплетном состоянии может взаимодействовать с молекулами в ближайшем окружении. Особый интерес для ФДТ представляет взаимодействие с молекулярным кислородом, основное электронное состояние которого является триплетным [148]. При этом взаимодействии образуются активные формы кислорода по двум конкурирующим группам реакций, в результате которых ФС возвращается в основное состояние [149]. Реакция типа I включает в себя перенос электрона/протона непосредственно от ФС к клеточным органическим субстратам (липидам, белкам, нуклеиновым кислотам и т. д.), в

результате чего образуются свободные радикалы или ионы-радикалы ФС и субстрата. В дальнейшем радикалы взаимодействуют с молекулярным кислородом с образованием активных форм кислорода (АФК), таких как перекись водорода (H_2O_2), супероксид-анион (O_2^-) и гидроксильный радикал ($-OH^\cdot$). Реакции II типа включают в себя образование нерадикального, но крайне реакционноспособного синглетного кислорода (1O_2) как следствие триплет-триплетного (разрешенного по спину) переноса энергии от ФС к молекулярному кислороду. Оба типа реакций вызывают окисление различных клеточных органелл и могут привести к гибели клеток [150, 151].

Соотношение вкладов реакций I и II типов зависят от строения ФС. Так, гидрофобные порфирины, хлорины и фталоцианины с большей вероятностью учувствуют в реакции II типа, однако бактериохлорины с большей вероятностью генерируют активные формы кислорода I типа из-за низкого значения разницы энергий высшей занятой и низшей незаполненной молекулярных орбиталей [152, 153]. Прямое сравнение вкладов механизмов типа I и типа II в эффективность ФДТ затруднено из-за сложности картины формирования активных форм с учетом всех факторов окружающей среды. Недавно был предложен новый тип ФС, действующий по III типу реакций: после облучения светом энергия возбуждения ФС передается непосредственно молекулам РНК, разрушая ее и индуцируя гибель клетки [154]. Кислород для данного типа реакций не требуется, поэтому ФС селективно повреждает опухолевые клетки действие как в нормальных, так и в гипоксических условиях.

Активные формы кислорода, образующиеся по реакциям I и II типа, могут вступать в прямую реакцию со многими биологическими молекулами, например, с аминокислотными остатками в белках или ДНК [149, 155]. Единого универсального пути гибели клеток в ответ на ФДТ не существует [156]. Реакция зависит от типа клетки, ее генетического и метаболического потенциала, а также от фотосенсибилизатора и, что наиболее важно, от его локализации [157, 158]. Повреждение сосудов, прямое повреждение клеток или активация иммунного ответа вследствие окислительного стресса под действием АФК инициирует гибель клетки через апоптоз, некроз или аутофагию [159].

Селективность ФДТ достигается за счет повышенной концентрации ФС в тканях-мишенях и ограниченным объемом облучения. Синглетный кислород является высоко реактивным и может распространяться всего на 0.01-0.02 мкм в течение своего короткого времени жизни (<0.2 мкс) [160]. Поэтому ФС должен быть локализован вблизи мишени в момент освещения. ФС может накапливаться в желаемом месте сам по себе или за счет связывания с молекулярными системами доставки, обладающими высоким сродством к тканям-мишеням [161, 162, 163].

1.2.2 Молекулярные мишени для ФДТ

Многообещающим подходом для повышения эффективности противораковой терапии является создание молекулярно направленных препаратов. G-квадруплексы ДНК являются уникальной структурами, которые часто встречаются в областях человеческого генома (промоторные области, концы теломер) [164, 165]. Различные лиганды способны взаимодействовать с G-квадруплексными структурами, оказывая стабилизирующее или дестабилизирующее воздействие, что позволяет модулировать их биологические функции [166]. Кроме того, многие лиганды G-квадруплексов изучаются в качестве противораковых агентов благодаря их способности ингибировать теломеразу, тем самым регулировать экспрессию онкогенов [167]. Таким образом, квадруплексы являются привлекательной мишенью для создания новых противораковых препаратов [19]. Уникальное структурное разнообразие квадруплексных структур создает перспективы для разработки селективных и высокоэффективных терапевтических агентов, направленных на конкретные G-квадруплексные мишени [167, 168].

G-квадруплексы - это участки ДНК, богатые гуанинами, которые способны образовывать особую конфигурацию, состоящую из сложенных в стопку плоских G-квартетов (рисунок 7), формирующиеся за счет Хугстиновского взаимодействия между четырьмя гуаниновыми основаниями [169]. Биофизические исследования с использованием олигонуклеотидов с последовательностями из участков теломер показали, что G-квадруплексные структуры образуются в условиях, близких к физиологическим *in vitro* [170]. Плоские G-квартеты стабилизируются катионами металлов (K^+ , Na^+ , Li^+), центрально координированными к атомам кислорода гуанинов. Квадруплексы могут быть унимолекулярными или межмолекулярными, а также способны принимать самые разнообразные топологии, возникающие из различных комбинаций направления нитей (рисунок 7, Б), длины и их состава петель. Выделяют антипараллельную, в которой пары цепей направлены в разных направлениях (в зависимости от типа петель разделяют на два вида: «кресло» и «корзина»), параллельную и гибридную (3+1), в которой только одна цепь идет в другом направлении. Тип складывания квадруплексного мотива трехмерную структуру связан с ориентацией основания и сахарного остатка: син- и анти-конформации различаются углом поворота основания вокруг N-гликозидной связи.

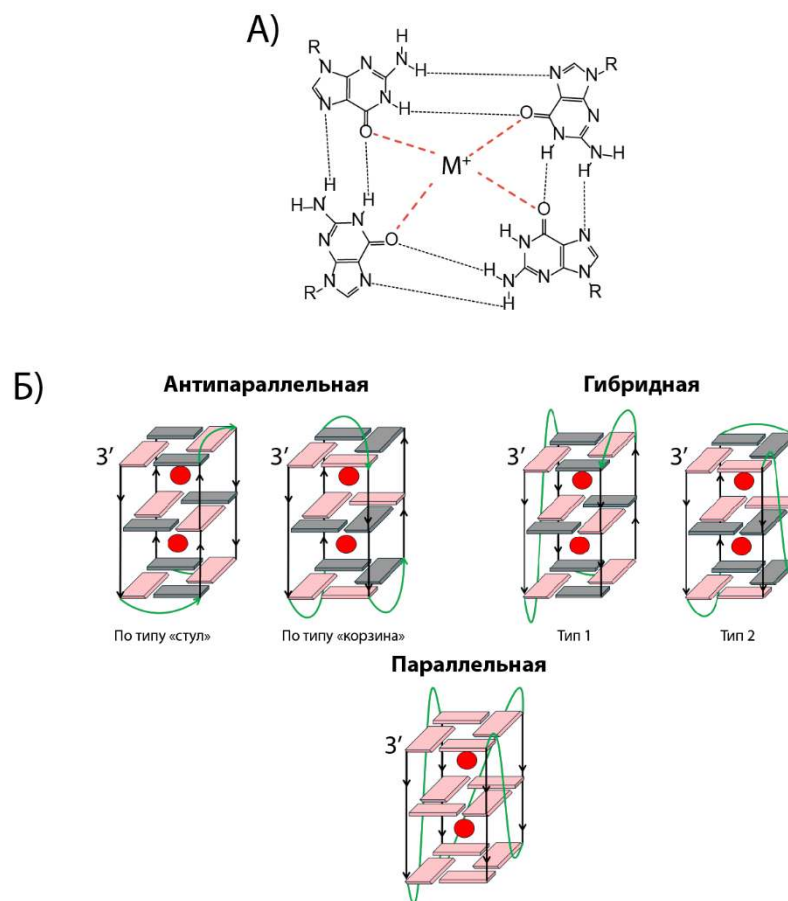


Рисунок 7. Особенности структуры квадруплексов. А) Химическая структура квартетов, Б) Схематическое изображение структур квадруплексов различающихся ориентацией цепей: фосфатная связь показана черной линией, участки связывания ионов металла изображены красным кружком, розовым цветом обозначены гуанины в анти-конформации, серым цветом – в син-конформации, зеленой линией показаны области петель.

Способность к бесконтрольному и неограниченному делению является отличительной чертой рака, и в ряде исследований было высказано предположение, что раковые клетки достигают способности к неограниченной пролиферации за счет специальной защиты концов хромосом [171]. Теломераза - это фермент обратной транскриптазы, который добавляет особые повторяющиеся участки к 3'-концам теломерной ДНК и высоко экспрессируется в большинстве раковых опухолей [172]. Теломерная ДНК человека, HTel-22, состоит из tandemных повторов последовательности 5'-TTAGGG-3' и на 3' конце заканчивается одноцепочечным хвостом, способным сворачиваться в квадруплексную структуру. Один из способов ингибирования действия теломеразы был достигнут с помощью малых молекул, которые стабилизируют G-квадруплексы и делают теломерные концы недоступными для удлинения теломеразой [173]. Таким образом, ингибирование активности теломеразы рассматривается как одно из потенциально эффективных решений при лечении рака. Кроме того, G-квадруплексы

представляют особый интерес в контексте ФДТ. Так, согласно последним исследованиям, формирование комплекса катионного порфирина с G-квадруплексом может приводить к значительному увеличению способности поглощения света в длинноволновой области спектра и эффективности генерации синглетного кислорода, поэтому поиск молекул с высокой специфичностью к G-квадруплексам и фотохимической активностью является актуальной задачей [174].

G-квадруплексы характеризуются выраженным структурным полиморфизмом, проявляя широкое разнообразие возможных конформаций и топологий [175, 176]. Это разнообразие, а также способность к лиганд-зависимым конформационным перестройкам, создают существенные сложности при исследовании их структуры и комплексов с лигандами традиционными методами (ЯМР, рентгеновская кристаллография). Особую проблему представляет также наличие фотоиндуцированных изменений конформации ДНК при облучении комплексов с фотосенсибилизаторами, что значительно осложняет интерпретацию экспериментальных результатов [177]. В связи с этим разработка новых методических подходов для изучения структуры комплексов G-квадруплексов с фотосенсибилизаторами и определения их лиганд- и фотоиндуцированных структурных перестроек в условиях существования множества конформаций является актуальной научной задачей.

Другим подходом для повышения эффективности противораковой терапии является использование человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) в качестве носителя ФС [13, 178, 179]. Альбумин является наиболее распространенным белком в плазме крови человека. Сывороточный альбумин человека представляет собой глобулярный белок 66.4 кДа, имеет один остаток триптофана (Trp214) и свободную цистеинил сульфгидрильную группу. Свободная -SH группа цистеина (34Cys) доступна для нитрозилирования. Вторичная структура белка организована тремя гомологичными доменами, каждый из которых состоит из двух субдоменов. Трехмерная структура ЧСА обладает сердцевидной формой (рисунок 8) и проявляет структурную гибкость в зависимости от pH раствора, а также при связывании с различными лигандами [1, 180, 181].

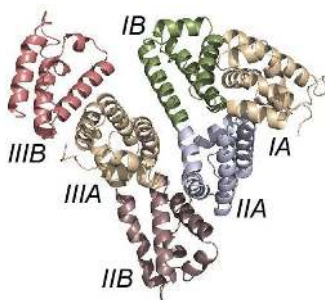


Рисунок 8. Кристаллическая структура ЧСА с указанием названий доменов.

Сывороточный альбумин способен связываться с ионами металлов и участвует в хранении и транспорте жирных кислот, билирубина, аминокислот, стероидных гормонов [18, 182, 183, 184, 185]. Два доминирующих сайта связывания с различными лигандами были определены Садлоу в 1975 году: сайт Садлоу I расположен в субдомене IА, а сайт Садлоу II - в субдомене IIIА [186]. Различия в размерах, полярности, формы лиганда влияют на его локализацию в комплексе с альбумином. Например, варфарин связывается с сайтом I, тогда как ибупрофен - с сайтом II [187]. Помимо двух основных сайтов связывания, ЧСА обладает сайтами связывания с различными металлами и 7-ю сайтами связывания жирных кислот [188, 189].

Структурная информация об комплексах фотоактивных лигандов с ЧСА может быть получена методом спектроскопии Ферстеровского резонансного переноса энергии (ФРПЭ), основанной на безизлучательном переносе энергии в результате диполь-дипольного взаимодействия между двумя флюоресцентными молекулами, хромоформами [190, 191]. Для выполнения ФРПЭ экспериментов необходимым условием является перекрытие спектра поглощения хромофора-акцептора и спектра флюоресценции хромофора-донора [192]. В контексте изучения взаимодействия альбумина с ФС данный метод позволяет оценить расстояния между остатком триптофана (Trp214) белка и лигандом посредством анализа тушения флуоресценции триптофана [193]. Однако недавнее исследование показало, что многие опубликованные ФРПЭ измерения для систем альбумин-лиганд не согласуются с кристаллографическими данными [194]. Основная проблема заключается в том, что ФРПЭ спектроскопия как "молекулярная линейка" предполагает однозначное соотношение донор-акцептор, что может не выполняться для альбумина с его множеством сайтами связывания лигандов. Это несоответствие может приводить к неточным измерениям расстояний, подчеркивая необходимость поиска дополнительных методик. Более того, интерпретация данных, полученных данным методом, основана на априорных предположениях об возможных сайтах связывания, что приводит к некорректной интерпретации данных при связывании в нестандартных сайтах [195, 196, 197].

1.2.3 Фотосенсибилизаторы

Для инициирования ФДТ необходимо перевести ФС в триплетное состояние лазерным импульсом, при этом длина волны облучения подбирается в соответствии с его электронным спектром поглощения. Диапазон длин волн для ФДТ составляет обычно составляет от 600 до 900 нм [198]. При длине волны ниже 600 нм часть света может поглотиться биомолекулами, в частности гемоглобином [199]. Причина верхнего предела в 900 нм заключается в том, что энергия за пределами этой длины волны недостаточна для образования синглетного кислорода.

ФС являются ключевым элементом в ФДТ. Идеальный ФС должен соответствовать следующим требованиям [200]: он должен эффективно генерировать синглетный кислород, обладать высоким коэффициентом поглощения в длинноволновой области (600–900 нм), быть стабильным и легко растворяться в инъекционных растворителях (водных растворах).

Одними из широко изученных и перспективных ФС являются тетрапирольные соединения, в частности порфирины, и их производные [201]. Порфирины – это макротетрациклические молекулы, образованные четырьмя пиррольными кольцами, соединенных по α -положениям метиновыми группами (рисунок 9, А). Порфирины обладают химической стабильностью, высоким коэффициентом экстинкции ($\sim 500000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и квантовым выходом генерации синглетного кислорода ($\sim 0.5\text{-}0.7$).

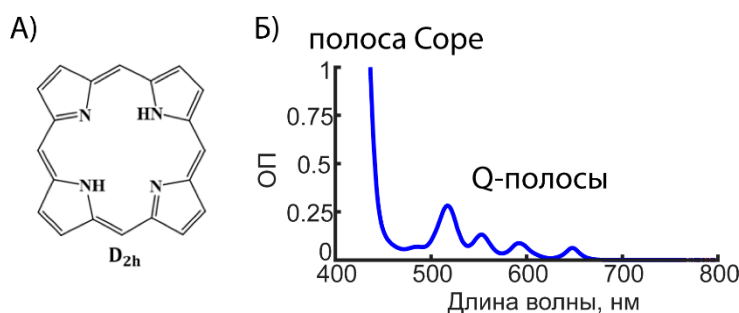


Рисунок 9. А) Структура макроцикла порфирина и его группа симметрии. Б) Пример оптического спектра порфирина.

Оптический спектр порфиринов обладает характерными чертами [18]. Для порфиринов с симметрично расположенными заместителями характерны интенсивная полоса Соре около 400 нм и четыре квази-запрещенные Q-полосы в диапазоне 500–650 нм (рисунок 9, Б). Полоса Соре является результатом разрешенного перехода во второе синглетное состояние (S_2), в то время как Q-полосы соответствуют запрещенному переходу в первое синглетное состояние (S_1). Так как порфирины с симметрично расположенными заместителями принадлежат к группе симметрии D_{2h} , то говорят о двух различных происхождениях Q-полос. В то время как полосы 1 и 3 относятся к переходам $A_{1g} \rightarrow B_{3u}$ и $A_{1g} \rightarrow B_{2u}$ соответственно, полосы 2 и 4 являются их колебательными сателлитами. В случае добавления ионов металла ($Zn(II)$, $Cu(II)$, $Ni(II)$ и др.) в ароматический центр порфирина, его группа симметрии меняется на D_{4h} , что приводит к объединению в один вырожденный энергетический уровень подуровней S_1 . Таким образом полосы 1 и 3 сливаются в одну, как и 2 и 4 становятся одним колебательным сателлитом. Поэтому в оптических спектрах металлопорфиринов видны только две Q-полосы [202].

Важно, что ЧСА и G-квадруплексы не являются инертными переносчиками, а способны изменять физико-химические свойства ФС (оптический спектр, флуоресценцию, время жизни и квантовый выход триплетного состояния, эффективность генерации синглетного кислорода)

[174, 203]. Понимание закономерностей связывания ФС с потенциальными средствами доставки имеет решающее значение в развитии метода ФДТ.

Порфирины известны как потенциальные лиганды для связывания с квадруплексами [204, 205]. Благодаря большому и плоскому ароматическому кольцу, порфирины способны эффективно взаимодействовать с G-квадруплексными структурами посредством стэкинг-взаимодействия, при этом положительно заряженные катионные заместители порфиринов еще больше усиливают сродство G-квадруплексам из-за электростатического взаимодействия с фосфатной основой ДНК [206]. Под действием света порфирины способны дестабилизировать структуру квадруплексной ДНК вследствие окисления гуанина синглетным кислородом [207]. Понимание, как порфирин при связывании с квадруплексами может влиять на их структуру, а также какие структурные изменения ДНК могут происходить при облучении, имеет решающее значение для рационального применения порфиринов как векторных молекул в терапевтических целях.

Понимание закономерностей связывания порфиринов с ЧСА имеет важное значение для успешного использования этих молекул в ФДТ. Будучи основным переносчиком малых молекул в крови, альбумин влияет на биораспределение лекарств, их фармакологию и потенциальные лекарственные взаимодействия [208]. Это особенно актуально для ФДТ, часто комбинируемой с другими противоопухолевыми методами лечения, которые могут взаимодействовать с фотосенсибилизаторами [209, 210, 211]. Среди всех порфириновых фотосенсибилизаторов рентгеноструктурные данные доступны только для гемового порфирина [212, 213], что создает неопределенность для других соединений. Структура комплексов фотосенсибилизатора с ЧСА может определяться различными факторами, такими как наличие заместителей в ФС, природой центрального иона-металла и pH среды. Поэтому для создания перспективных фотосенсибилизаторов для ФДТ важно понимать, как и в какой степени, структура фотосенсибилизатора влияет на связывание с альбумином. Кроме того, определение локализации связывания лекарств с ЧСА дает информацию об потенциальной конкуренции противораковых препаратов с другими лекарственными средствами, локализующимися в том же месте.

Одним из наиболее широко известных катионных порфиринов является мезо-тетра(4-N-метилпиридил)порфин (ТМРyP4, рисунок 10) в форме йодида и его производные. ТМРyP4 характеризуется высоким квантовым выходом синглетного кислорода, равным 0.7 [214]. Ранее данное соединение активно изучалось в качестве ФС для ФДТ как лиганд для связывания с G-квадруплексами [215, 216, 217, 218]. Преимуществом катионного ТМРyP4 также является преобладание мономерной формы в водных растворах [219].

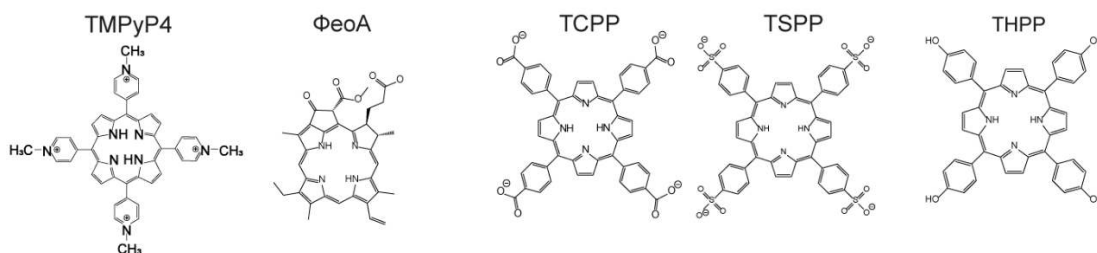


Рисунок 10. Структуры потенциально эффективных ФС

Другим важным ФС является Феофорбид А ((3S,4S)-9-этенил-14-этил-21-(метоксикарбонил)-4,8,13,18-тетраметил-20-оксо-3-форбинпропановая кислота, ФеоА, рисунок 10) [220]. ФеоА является продуктом дефитилирования и демеаллирования хлорофилла А, который образуется в водорослях и высших растениях [221]. ФеоА состоит из тетрапиррольного макроцикла, содержащего четыре метильных группы, одну этильную, одну винильную, одну метоксикарбонильную и одну пропионильную группы в качестве заместителей. УФ-видимый спектр ФеоА типичен для соединений типа хлорофилла а с полосой Core при 390 нм и Q-полосами в диапазоне 500–700 нм. Q-полоса при 670 нм обладает относительно высокой интенсивностью, что делает ФеоА потенциально перспективным ФС для ФДТ. В растворе этанола квантовый выход синглетного кислорода для ФеоА составляет 0.59 [222]. Однако плоские макроциклы склонны к агрегации в водных растворах, что значительно снижает квантовый выход синглетного кислорода. Действительно, в агрегированном состоянии ФеоА демонстрирует квантовый выход синглетного кислорода < 0.01 , что подчеркивает необходимость использования средств доставки для высокой эффективности ФДТ [222].

Анионные водорастворимые порфириновые производные такие как мезо-тетра(4-карбоксифенил)порфирин (TCPP), а также мезо-тетра-(4-сульфонатофенил)порфирин (TSPP) также являются потенциально эффективными ФС для ФДТ (рисунок 10) [223, 224, 225, 226]. Несмотря на многочисленные исследования применения TCPP [227, 228], структурная информация о его взаимодействии с ЧСА отсутствует. Обычно лиганды с отрицательно заряженными группами связываются с альбумином в сайтах гема или сайтах Садлоу I и II [204, 229, 230], что позволяет предположить, что TCPP может связываться именно там. В предыдущих работах связывание TSPP с альбумином исследовалось методами флуоресценции [196] и молекулярного докинга [195]. В работе [196] сообщалось, что эксперименты по тушению флуоресценции Trp214 указывают на расположение SO_3^- группы TSPP вблизи Trp214. Однако отсутствие регистрируемого сигнала флуоресценции не позволило авторам определить точное расстояние между триптофаном и лигандом. Для решения этой проблемы ими были проведены последующие молекулярные расчеты, исследовавшие несколько потенциальных областей

связывания. Эти расчеты предсказали место связывания вблизи низкоаффинного сайта ибупрофена, руководствуясь близостью TSPP к триптофану. В другом исследовании [231] был предсказан иной сайт связывания TSPP с использованием исключительно слепого докинга. Выбор позы с наилучшей энергией связывания привел авторов к предположению, что TSPP связывается на поверхности домена III, что противоречит данным флуоресценции в работе [196].

Основной проблемой в ФДТ является агрегация фотосенсибилизаторов, которая подавляет генерацию активных форм кислорода [232]. Один из предложенных способов решения этой проблемы – использование катионных фотосенсибилизаторов, которые агрегируют значительно меньше анионных [233, 234]. Однако, несмотря на их потенциальные преимущества, структурная информация о связывании катионных фотосенсибилизаторов с ключевыми транспортными белками, включая альбумин, крайне ограничена.

Другим потенциально эффективным ФС является нейтральный порфирин 5,10,15,20-тетракис(4-гидроксифенил)порфирин (THPP, рисунок 10) [235, 236]. Ранее в исследованиях локализация THPP предсказывалась с использованием флуоресцентных методов и процедур докинга [195]. С помощью ФРПЭ спектроскопии (при соотношении концентраций ЧСА: THPP = 1:1), было определено среднее расстояние 4.18 нм между THPP и остатком Trp214. Наиболее вероятная позиция связывания, полученная методом молекулярного докинга, располагается в домене III.

Все вышеперечисленные исследования связывания ФС с альбумином не учитывают возможность связывания лиганда во множестве сайтов одновременно, а также возможность наличия нестандартных сайтов. Поэтому разработка дополнительных методов для точного определения сайтов связывания ФС на альбумине при наличии множества различных позиций связывания является актуальной задачей.

1.3 Заключение

Таким образом, анализ литературных данных показал, что уникальные преимущества фотовозбужденного триплетного состояния как нового класса спиновых меток открывают новые возможности изучения структуры и функций комплексов сложных биомолекул для дизайна эффективных ФС для ФДТ. Различные экспериментальные методы часто сталкиваются с ограничениями на размер системы, специальные требования к подготовке образцов, высокую стоимость эксперимента и сложную обработку данных. В то же время дипольная ЭПР-спектроскопия позволяет детектировать множество сосуществующих конформаций в

биологической системе, включая все возможные варианты связывания в комплексах с различными лигандами.

Разработка лигандов, структурно ориентированных на взаимодействие с неканоническими конформациями ДНК, такими как G-квадруплексы, представляет собой перспективное направление для усовершенствования противораковой терапии. К началу выполнения данной работы светоиндуцированная дипольная ЭПР-спектроскопия использовалась исключительно для структурного анализа белковых комплексов. Однако идея использовать молекулу фотосенсибилизатора в качестве спиновой метки открывает новые перспективы для структурных исследований не только белков, но и других классов биомолекул, включая G-квадруплексные структуры.

Другим подходом для повышения эффективности противораковой терапии является использование человеческого сывороточного альбумина в качестве носителя молекулы лекарственного препарата. Обычно для получения структурной информации об комплексах фотоактивных лигандов с альбумином используется ФРПЭ спектроскопия. Однако при связывании с альбумином лиганда во множестве сайтов одновременно, а также возможность наличия нестандартных сайтов может приводить к неточным измерениям расстояний данным методом. Поэтому разработка дополнительных методов для точного определения сайтов связывания фотосенсибилизаторов на альбумине является актуальной задачей.

Несмотря на высокий потенциал фотовозбужденных триплетных состояний в роли спиновых меток, их практическая реализация затруднена спецификой лазерного оборудования и собственной физической природой этих состояний. Данные факторы требуют поиска новых подходов в импульсном ЭПР, которые позволили бы компенсировать низкую частоту повторения импульсов за счет существенного усиления полезного сигнала.

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 ТМРуР4 (мезо-тетра(N-метил-4-пиридил) 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.

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ДИПОЛЬНОЙ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ G4-ДНК С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ

2.1 Введение

G-квадруплексы играют важную роль в регуляции экспрессии генов и поддержании стабильности теломер, а также рассматриваются как перспективные мишени для разработки противоопухолевых препаратов. Особый интерес вызывают их комплексы с ФС, способными вызывать структурные изменения квадруплексных платформ под действием света. Однако высокая топологическая изменчивость G-квадруплексов и сложность систем ограничивают возможности традиционных методов (ЯМР, рентгеноструктурный анализ) в изучении таких взаимодействий.

В данной главе представлен 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. Объектом исследования послужил комплекс теломерной ДНК человека HTel-22 с катионным порфирином TMPyP4, представляющим интерес как модель системы, активно вовлеченной в регуляцию клеточного деления и являющейся перспективной мишенью в фотодинамической терапии. Представленный подход позволяет выявлять топологические формы G-квадруплекса, определять локализацию лиганда, а также отслеживать структурные перестройки, индуцированные действием света. Результаты, описанные в этой главе, опубликованы в работе [10].

2.2 Экспериментальная часть

Для данной работы к.х.н. А. С. Чубаровым (ИХБФМ СО РАН) были синтезированы производные HTel-22 с тиофосфатной модификацией [PS] остатка фосфорной кислоты (таблица 1) в определенных сайтах, по которым вводились спиновые метки (рисунок 11).

Во всех экспериментах квадруплексные структуры формировались в присутствии 100 мМ ионов K^+ . Использование раствора K^+ обусловлено его биологической значимостью, учитывая высокую внутриклеточную концентрацию K^+ [237]. Для образования G-квадруплексов была проведена следующая процедура: растворы HTel-22 нагревали в 10 мМ Tris-HCl буфере (pH 7.5) с содержанием 100 мМ KCl в течении 5 минут до 95 °C, затем медленно охлаждали до комнатной температуры и оставляли на хранение при комнатной температуре на ночь. Для формирования комплекса квадруплексных структур с лигандом готовили стоковые растворы TMPyP4 (Sigma-

Aldrich, США) в тех же буферах, что использовались для олигонуклеотидов, с концентрацией 1.25 мМ. ТМРyP4 разбавляли до 0.2 мМ в растворе с 0.1 мМ ДНК, и образцы интенсивно перемешивали в течение 5 минут.

Таблица 1. Исследуемые последовательности ДНК

Аббревиатура	Последовательность
wt HTel-22	5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'
HTel-22(G3;G15)	5'-AG[PS]GGTTAGGGTTAG[PS]GGTTAGGG-3'
HTel-22(G3)	5'-AG[PS]GGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'

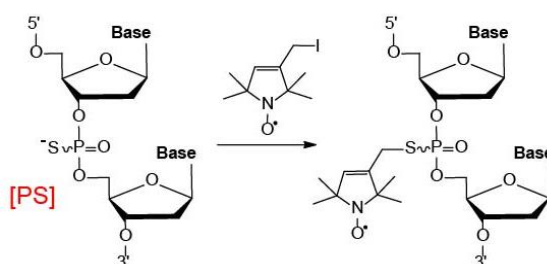


Рисунок 11. Схема селективного спин-мечения олигонуклеотидов. Спиновая метка прикрепляется к модификации [PS] остатка фосфорной кислоты.

Для измерений методом ЭПР в раствор добавляли дейтерированный глицерол-d8 с объемным соотношением 1:1 за 5 минут до шоковой заморозки. Финальные образцы для ЭПР-экспериментов содержали 0.05 мМ HTel-22. Образцы, используемые для изучения связывания лиганда и светоиндуцированных структурных изменений, также содержали 0.1 мМ ТМРyP4.

Фотолиз образцов был выполнен следующим образом: образец объемом 5 мкл, содержащий 0.2 мМ порфирина и 0.1 мМ HTel-22, непрерывно в течении часа облучали через верхнюю часть пробирки светодиодом, расположенным на расстоянии 4 см, при мощности излучения 60 мВт с диапазоном излучаемых длин волн от 485 до 800 нм. Для дальнейших ЭПР-экспериментов в раствор добавляли дейтерированный глицерол по процедуре, описанной выше.

Импульсные ЭПР-эксперименты проводились на спектрометре Bruker ELEXSYS E580, оснащенном Q-диапазонным резонатором EN5107D2 и системой контроля температуры Oxford Instruments. Образцы помещали в кварцевые трубки (внешний диаметр 1.7 мм, внутренний диаметр 1.1 мм) объемом 10 мкл. Образцы быстро замораживали в жидком азоте перед помещением в предварительно охлажденный резонатор. Фотовозбуждение образцов осуществляли с использованием второй гармоники (532 нм) импульсного высокоэнергетического лазера с диодной накачкой LOTIS TII LS-2146 с частотой повторения

импульсов 25 Гц. Длительность лазерного импульса составляла 15 нс со стандартным отклонением 150 пс, джиттер — 500 пс, энергия на импульс — 3–4 мДж.

Эксперименты ДЭЭР проводились при температуре 50 К с использованием последовательности с временными задержками $d_1=340$ нс, $d_2=3500$ нс. Длительность импульса накачки составляла 18 нс, а длительность импульсов на частоте наблюдения $\pi/2$ и π — 10 нс и 20 нс соответственно. Разница частот между позицией накачки (ν_1) и наблюдения (ν_2) составляла 60 МГц, при этом импульс накачки был настроен на максимум ЭПР-спектра нитроксильного радикала. Шаг изменения положения накачивающего импульса составлял 12 нс. Была использована двухшаговая процедура усреднения модуляции ESEEM по дейтерию по позиции первого импульса [238].

Временные зависимости, полученные методом РеФИМД спектроскопии, были зарегистрированы при температуре 30 К с использованием временных задержек $d_1 = 3000$ нс, $d_2 = 300$ нс. Двухшаговое фазовое циклирование было применено к первому импульсу для вычета базовой линии. Задержка перед лазерной вспышкой увеличивалась с шагом 8 нс. Измерения проводились при значении магнитного поля, соответствующем максимуму спектра нитроксильного радикала. Общее количество сканов составило 20.

Эксперименты стационарной ЭПР-спектроскопии проводились в X-диапазоне (9.8 ГГц) при комнатной температуре с помощью спектрометра Bruker EMX. Параметры эксперимента были следующими: мощность микроволнового излучения – 1.26 мВт, амплитуда модуляции – 0.1 мТл, частота модуляции 100 кГц, количество сканирований – 40.

Все полученные данные в экспериментах ДЭЭР и РеФИМД спектроскопии были обработаны с помощью DeerAnalysis2019. Распределения дважды меченных HTel-22 в экспериментах ДЭЭР были получены методом DEERNet. Распределение моно меченных производных HTel-22 в экспериментах ДЭЭР и РеФИМД спектроскопии были получены регуляризацией Тихонова.

Эксперименты спектроскопии кругового дихроизма с HTel-22 и его спин-меченными производными проводились с использованием спектрометра Jasco 600 (Jasco Instruments, Токио, Япония) в кварцевой кювете со световым путем 0.1 см. Измерения проводились в диапазоне длин волн 330–200 нм с шагом в 1 нм. Из полученных спектров вычитался спектр буфера.

Оптические измерения проводились на спектрофотометре Agilent Cary в кварцевой кювете со световым путем 1 см при комнатной температуре. Спектры образцов были сняты с шагом 1 нм и задержкой между каждым шагом 500 мс. Пошаговое титрование проводилось при постоянной концентрации порфирина (4 мкМ) при соотношениях [ДНК]:[TMPyP4] = 1:20; 1:10;

1:7. 5; 1:6; 1:5; 1:2.5; 1:2; 1:1; 1:0.66. Из полученных спектров вычитался спектр буферного раствора.

2.3 Результаты и обсуждение

2.3.1 Влияние спиновых меток на G-квадруплексы HTel-22

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. Метка может быть присоединена к любому фосфату между нуклеотидами основной цепи, что является одним из преимуществ данного метода спинового мечения [239]. Спиновые метки были введены в положения G3 и G15, расположенные в области тетрады квадруплекса со значительной жесткостью [240]. Такие сайты введения метки в сочетании с коротким линкером существенно ограничивают конформационную подвижность метки. Эффективность спинового мечения для дважды и моно-меченых производных, оцененная по данным стационарной ЭПР-спектроскопии, составила 1.9 и 0.8 спинов на одну молекулу HTel-22 соответственно.

Чтобы понять, вызывают ли спиновые метки, введенные в положения G3 и G15, возмущения в структуре квадруплекса, были записаны спектры кругового дихроизма (рисунок 12). Спектр для нативного типа согласуется с ранее опубликованными данными для HTel-22 в присутствии ионов K^+ [241]. Спин-меченые производные олигонуклеотида демонстрируют спектральные профили, аналогичные нативному.

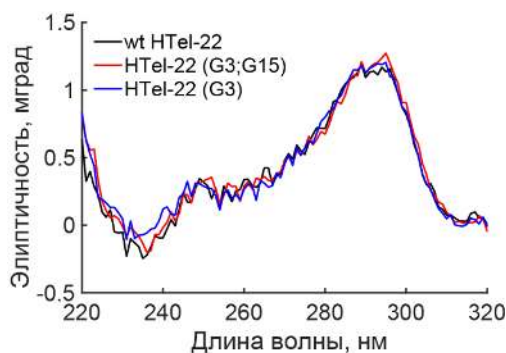


Рисунок 12. Спектры кругового дихроизма немодифицированного (wt) (черная линия), дважды меченного (G3; G15) (красная линия) и однократно меченного HTel-22 (синяя линия).

Также было определено влияние спиновых меток на кинетику связывания ТМРурР4 с HTel-22 с помощью оптической спектроскопии поглощения (рисунок 13). Для этого были записаны спектры поглощения растворов ТМРурР4 с концентрацией 4 мкМ при различной концентрации HTel-22 (нативный тип и спин-меченые производные). При добавлении HTel-22 интенсивность

полосы Соре порфирина уменьшается, а также ее положение смещается в красную область. В ходе эксперимента регистрировалась оптическая плотность (ОП) при 421 нм в каждой точке титрования (рисунок 13, вставленные графики).

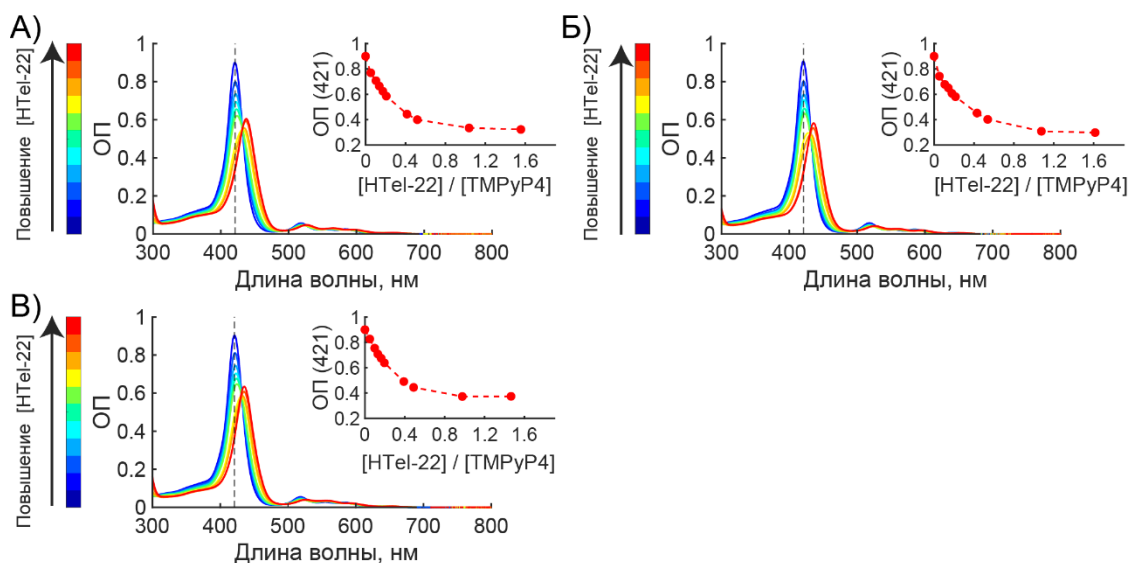


Рисунок 13. Оптические спектры поглощения ТМРур4 в зависимости от концентрации НТел-22 в немодифицированном виде (А) и его спиновых производных: НТел-22 (G3) (Б) и НТел-22 (G3; G15) (В). Концентрация ТМРур4 составляла 4 мкМ, в то время как концентрации ДНК варьировались от 0 до 6 мкМ. Вставленные графики демонстрируют уменьшение оптической плотности при 421 нм.

Доля связанного ТМРур4 рассчитывалась с помощью следующего уравнения:

$$C = \frac{A_f - A}{A_f - A_b}, \quad (27)$$

где A_f и A_b — ОП при 421 нм свободного и полностью связанного с олигонуклеотидом ТМРур4 соответственно, A — текущая концентрация ТМРур4.

Нативный тип и меченые производные НТел-22 демонстрируют сходные кривые связывания (рисунок 14). Таким образом, введение спиновых меток не влияет на кинетику формирования комплекса ТМРур4 / НТел-22. Доля связанного порфирина достигает 80% при двукратном избытке ТМРур4 по отношению к НТел-22, что указывает на существование двух сайтов связывания в НТел-22 для ТМРур4. При дальнейшем увеличении концентрации ДНК прирост доли связанного порфирина замедляется, достигая насыщения при равенстве концентраций ТМРур4 и НТел-22, что говорит о связывании всего порфирина с ДНК.

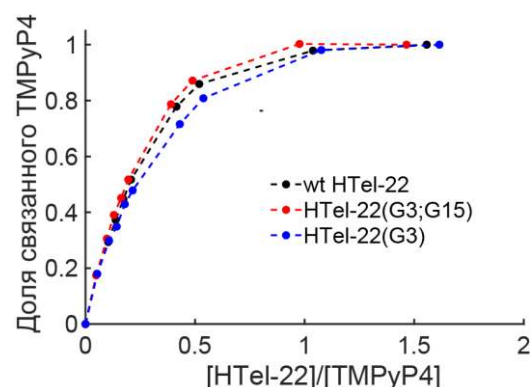


Рисунок 14. Доля связанного TMPyP4, полученная методом титрования. Концентрации HTel-22 варьируются от 0 до 6 мкМ, в то время как концентрация TMPyP4 поддерживается постоянной на уровне 4 мкМ.

2.3.2 Структура G-квадруплекса HTel-22

Ранее было показано, что HTel-22 образует несколько конформаций G-квадруплексов в присутствии K^+ : параллельные, антипараллельные и гибридные [242, 243]. Однако два независимых исследования, проведенные с использованием методов дипольной ЭПР-спектроскопии, продемонстрировали, что в присутствии K^+ HTel-22 принимает исключительно параллельные и антипараллельные топологии, не образуя при этом гибридных структур [240, 244].

С целью определения, какие квадруплексные структуры HTel-22 реализуются в экспериментальных условиях, используемых в данной работе, были проведены эксперименты ДЭЭР для дважды меченной производной HTel-22 (G3;G15), положения импульсов накачки и наблюдения представлено на рисунке 15.

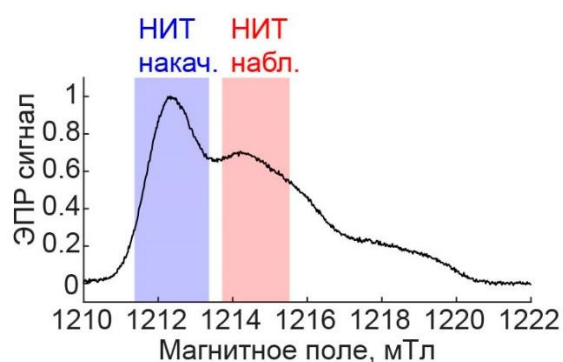


Рисунок 15. Эхо-детектируемый (ЭД) спектр для комплекса TMPyP4/HTel-22(G3; G15) при 50 К в отсутствии лазерных импульсов. Выделенные области показывают позиции импульсов накачки и наблюдения, а также их спектральную ширину возбуждения.

На рисунке 16 представлены полученные временные зависимости и соответствующие функции распределения расстояний между двумя нитроксильными метками HTel-22(G3; G15).

Наблюдаемая глубина модуляции ($\lambda=24\%$) близка к максимальному значению (22-24%) для пары нитроксильных радикалов. Распределения по расстояниям, полученные для HTel-22 (G3;G15) без лиганда, демонстрируют бимодальное распределение с пиками на 1.9 нм и 2.8 нм. Эти результаты согласуются с ранее опубликованным исследованием, где структура HTel-22 изучалась с использованием той же метки [240].

Для определения реализующихся топологий квадруплекса HTel-22 было проведено моделирование распределений, полученных в экспериментах ДЭЭР. Моделирование было проведено м.н.с. лаб. ЭПР-спектроскопии МТЦ СО РАН Колоколовым М. И. Данные моделирования распределений по расстояниям указывают на то, что два пика в распределении G3-G15 соответствуют двум различным топологиям квадруплексов: первый пик со средним расстоянием 1.9 нм связан с антипараллельной структурой, тогда как второй пик на 2.8 нм соответствует параллельной конфигурации (рисунок 17). Расхождение между расчетными и экспериментальными пиками не превышает 4 ангстрем. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными результатами в работе [240].

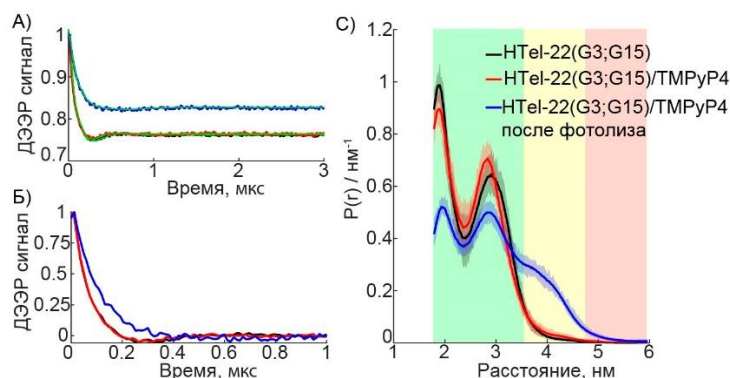


Рисунок 16. Эксперименты ДЭЭР для дважды меченного комплекса TMPrP4/HTel-22 (G3;G15) при 50 К без TMPrP4 (черные линии) и с TMPrP4 до (красные линии) и после фотолиза в течение 60 минут (синие линии). А) Временные зависимости после вычета базовой линии и результаты их моделирования (зеленые линии) Б) Временные зависимости, нормированные на глубину модуляции С) Нормированные на глубину модуляции рассчитанные профили распределения расстояний с указанием границ погрешностей. Различными цветами указаны диапазоны достоверности: зеленая область-достоверна форма распределения, желтая-достоверно среднее значение и ширина распределения, красная-только среднее значение.

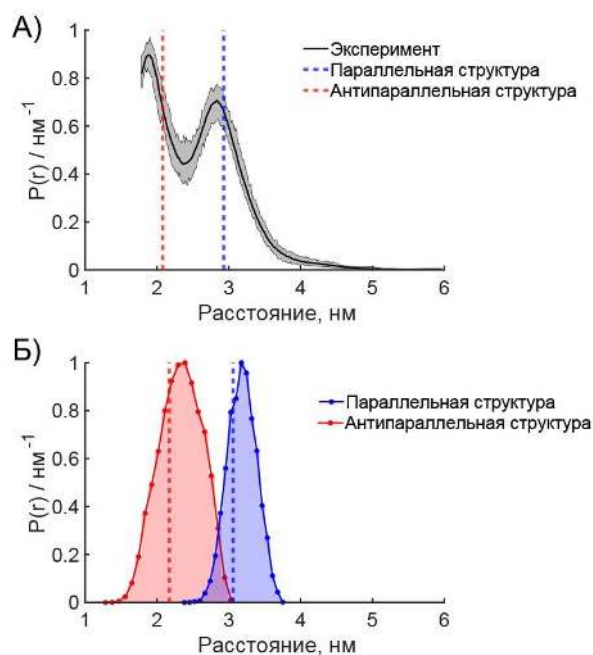


Рисунок 17. А) Распределение по расстояниям, нормализованное на глубину модуляции, полученное с помощью эксперимента ДЭЭР для дважды меченной производной H1Tel-22 (G3; G15) при 50 К. Пунктирные линии обозначают экспериментально полученные расстояния из работы [240]. Б) Гистограммы статистических распределений расстояний между нитроксильными метками для параллельной и антипараллельной конформаций. Пунктирные линии показывают средние расстояния, полученные из моделирования в работе [240].

Ранее опубликованные исследования квадруплексных структур показали, что связывание лиганда может вызывать переход между различными топологиями или способствовать образованию специфических топологий [245, 246]. Поскольку данные ЭПР-спектроскопии позволяют достоверно различить две различные топологии H1Tel-22, то также возможно отслеживать изменения вкладов в распределении различных структур и делать выводы о появлении новых. Так, результаты экспериментов дипольной ЭПР-спектроскопии однозначно указывают на то, что связывание H1Tel-22 с TMRyP4 не вызывает значительных конформационных переходов.

После фотооблучения комплекса H1Tel-22 (G3;G15)/TMRyP4 уменьшается глубина модуляции с 24% до 17%, а также изменяется форма временных зависимостей. Распределение расстояний после фотолиза однозначно показывает появление новых расстояний между парой нитроксильных радикалов в диапазоне 3.5-5 нм. Столь значительные структурные изменения свидетельствуют о разрушении квадруплексной укладки ДНК в результате фотолиза.

2.3.3 Локализация ТМРyР4 в комплексе с НТел-22

Хотя ТМРyР4 является широко известным лигандом для НТел-22, детали его взаимодействия с различными структурами G-квадруплексной ДНК до сих пор полностью не изучены: на данный момент не опубликована кристаллическая или ЯМР структура комплекса (за исключением одной, полученной для бимолекулярного теломерного квадруплекса) [204]. Моделирование методом молекулярной динамики и экспериментальные исследования указывают на то, что ТМРyР4 наиболее эффективно связывается с параллельной структурой НТел-22 на концах (позиции РТ1 и РТ2 на рисунке 18), для антипараллельной конфигурации сообщается о двух структурах комплекса, которые, согласно моделированию, считаются наиболее вероятными [216, 247]. В одном из вариантов ТМРyР4 предпочтительно связывается с антипараллельным НТел-22: ТМРyР4 связывается с ДНК между диагональной петлей и тетрадой (G2, G10, G14, G22) (верхняя тетрада на рисунке 18, позиция АРТ1). Также была опубликована еще одна структура комплекса ТМРyР4 с антипараллельной конфигурацией: порфирин расположен на противоположной стороне квадруплекса рядом с тетрадой (G4, G8, G20, G16) (нижняя тетрада на рисунке 18, позиция АРТ2) [216].

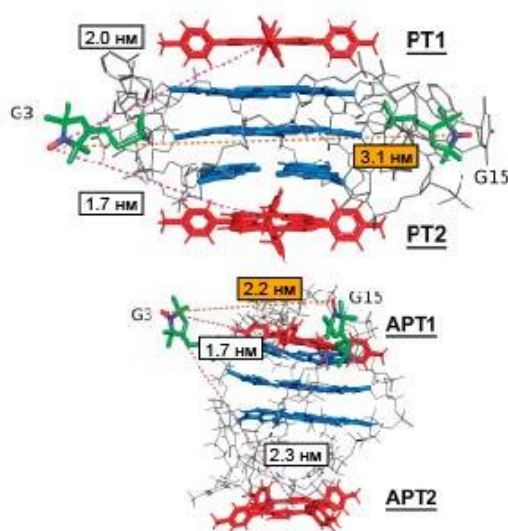


Рисунок 18. Топологии комплекса НТел-22/ТМРyР4: параллельная (сверху), антипараллельная (снизу). На рисунке также указаны средние расстояния между нитроксильной меткой, введенной в положение G3, и ТМРyР4, а также расстояния между нитроксильными метками, введенными в положения G3 и G15 (выделены оранжевым цветом). Порфирины (выделены красным) локализованы в позициях РТ1 и РТ2 для параллельной конфигурации, и в АРТ1 и АРТ2 для антипараллельной конфигурации. Тетрады гуанинов выделены синим цветом для наглядности.

Для определения локализации ТМРyР4 в комплексе с НТел-22(G3) был использован метод РеФИМД спектроскопии (рисунок 19). В этом эксперименте регистрируется сигнал

нитроксильной метки, селективно введенной в положение G3 олигонуклеотида, при этом возбуждение триплетного состояния порфирина происходит при различном положении лазерного импульса относительно микроволновых импульсов.

Полученная временная зависимость (рисунок 20, А) содержит дипольную модуляцию с глубиной 33%. Соответствующее распределение расстояний, полученное с использованием регуляризации Тихонова, содержит один широкий пик со средним расстоянием 2.20 нм (рисунок 20, В). Одной из причин столь широкого распределения является наличие нескольких сайтов связывания порфирина с ДНК.

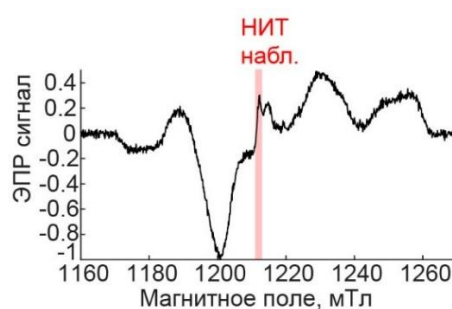


Рисунок 19. Эхотектируемый спектр комплекса TMRyP4/HTel-22(G3) при 30 К при возбуждении лазерными импульсами триплетного состояния порфирина. Выделенная красным область показывает позицию импульса наблюдения, а также спектральную ширину возбуждения импульсами наблюдения.

Среднее расстояние в экспериментально полученных распределениях (2.06 нм) согласуется со средним значением, рассчитанным с помощью моделирования для позиции РТ1 (2.0 нм, рисунок 20, Г). Однако ширина распределения для этого сайта связывания заметно меньше, чем в экспериментальных данных. Короткие расстояния в распределении могут быть связаны со структурами, в которых порфирин локализован в позициях РТ2 и АРТ1 (для этих позиций распределение расстояний содержит пики при 1.7 нм). Значительный вклад расстояний, превышающих 2.3 нм, которые были обнаружены экспериментально, можно объяснить только предположением о локализации порфирина в позиции АРТ2. Таким образом, наши данные представляют собой первое экспериментальное подтверждение локализации TMRyP4 в позиции АРТ2, которая ранее была предсказана на основе моделирования [216].

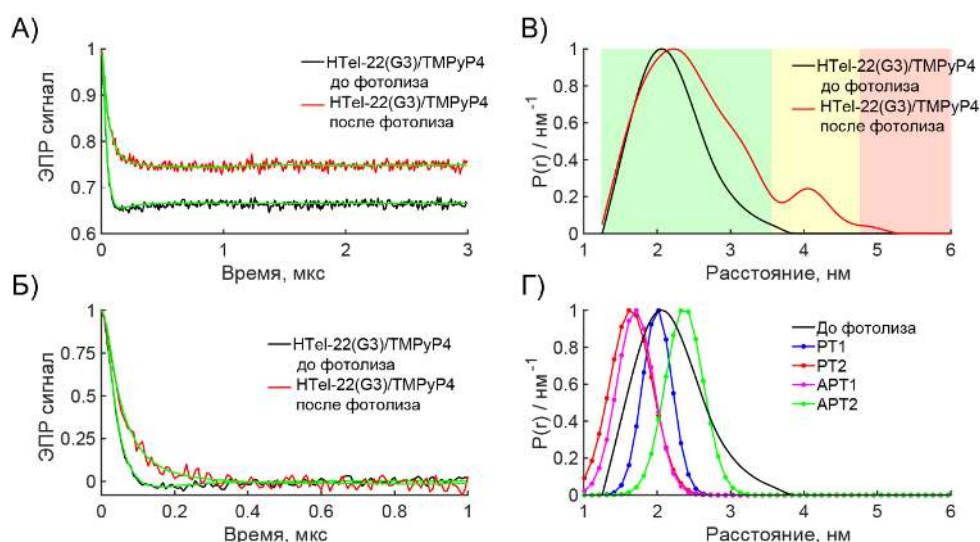


Рисунок 20. Эксперименты РеФИМД спектроскопии для комплекса ТМРурР4/НТел-22 (G3) при 30 К до (черные линии) и после (красные линии) фотолиза. А) Временные зависимости после вычета базовой линии и результаты их моделирования (зеленые линии). Б) Временные зависимости, нормированные на глубину модуляции, и их наилучшие аппроксимирующие кривые, полученные с использованием регуляризации Тихонова. В) Нормированные на максимум интенсивности рассчитанные профили распределения расстояний. Различными цветами указаны диапазоны достоверности: зеленая область-достоверна форма распределения, желтая- достоверно среднее значение и ширина распределения, красная-только среднее значение. Г) Рассчитанное распределение расстояний до фотолиза (черная линия) и гауссовы аппроксимации рассчитанных из моделирования методом молекулярной динамики гистограмм, соответствующие различным позициям ТМРурР4 в комплексе.

Среднее расстояние в экспериментально полученных распределениях (2.06 нм) согласуется со средним значением, рассчитанным с помощью моделирования для позиции РТ1 (2.0 нм, рисунок 20, Г). Однако ширина распределения для этого сайта связывания заметно меньше, чем в экспериментальных данных. Короткие расстояния в распределении могут быть связаны со структурами, в которых порфирин локализован в позициях РТ2 и АРТ1 (для этих позиций распределение расстояний содержит пики при 1.7 нм). Значительный вклад расстояний, превышающих 2.3 нм, которые были обнаружены экспериментально, можно объяснить только предположением о локализации порфирина в позиции АРТ2. Таким образом, наши данные представляют собой первое экспериментальное подтверждение локализации ТМРурР4 в позиции АРТ2, которая ранее была предсказана на основе моделирования [216].

2.3.4 Светоиндуцированные изменения структуры НТел-22

ТМРурР4 является известным фотосенсибилизатором, способным генерировать синглетный кислород под действием света [3, 248]. Гуанин, основной компонент квадруплексных

структур, легко окисляется синглетным кислородом, что может привести к структурным изменениям ДНК [249].

После фотолиза интенсивность эхо-детектируемых (ЭД) спектров как триплетного состояния порфирина, так и стабильной метки уменьшилась (для триплетного состояния порфирина на 30%, для нитроксильного радикала на 15–20%), что указывает на частичную деградацию ТМРyP4 и нитроксильного радикала (рисунок 21). Кроме того, в результате фотолиза происходит уменьшение глубины дипольной модуляции в ДЭЭР для комплексов НТел-22 (G3; G15) и в РеФИМД спектроскопии для НТел-22(G3)/ТМРyP4.

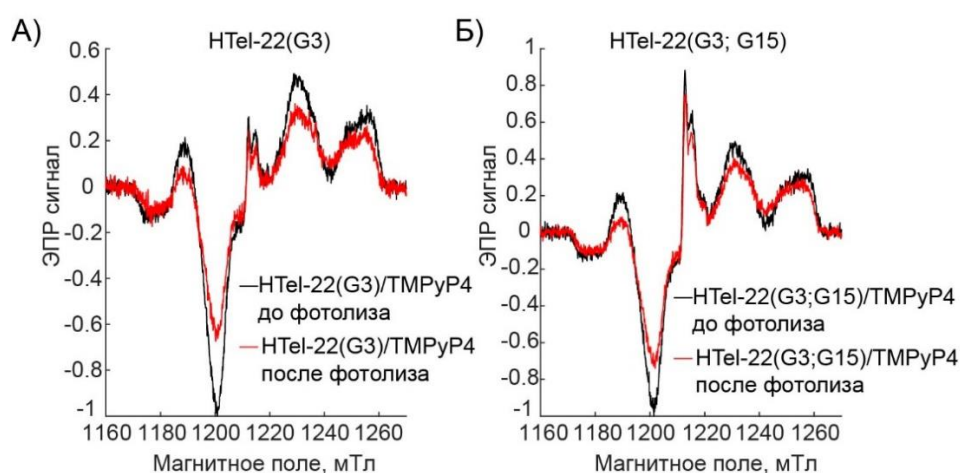


Рисунок 21. ЭД спектры до и после фотолиза комплексов (А) ТМРyP4 / НТел-22(G3), (Б) ТМРyP4 / НТел-22(G3;G15)

Для объяснения данных эффектов были проведены исследования методом стационарной ЭПР-спектроскопии комплексов НТел-22 (G3; G15) и НТел-22 (G3) с порфирином до и после фотолиза при комнатной температуре. Было обнаружено, что фотолиз комплексов ТМРyP4/НТел-22 приводит к уменьшению общей концентрации спинов на 20–25%. Кроме того, после фотолиза значительно меняется форма ЭПР-спектра (рисунок 22).

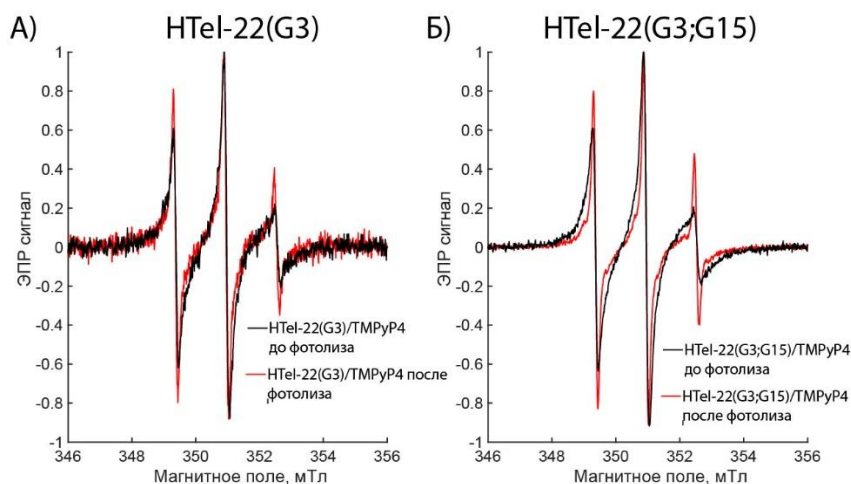


Рисунок 22. Спектры стационарного ЭПР при комнатной температуре комплексов ТМРyР4 с (А) НТел-22(Г3) и с (Б) НТел-22(Г3:Г15) до фотолиза (черная линия) и после (красная линия).

Чтобы определить долю свободных нитросильных меток до и после фотолиза, проведено моделирование спектров ЭПР, результаты которого представлена на рисунке 23. Параметры моделирования, оцененные с помощью пакета Easyspin [250], представлены в таблице 2. Точное моделирование спектров является сложной задачей из-за высокой степени полиморфизма и наличия конформационных переходов квадруплекса, поэтому для моделирования экспериментальных спектров было сделано несколько предположений. ЭПР-спектры до облучения моделировались с учетом только одной фракции (связанной) с временем вращательной корреляции (τ_c) 1.2 нс с учетом анизотропного движением в ориентирующем потенциале. После фотолиза учитывалось наличие двух различных фракций (свободной и связанной), характеризующихся разными временами вращательной корреляции нитроксильной метки и ориентирующими потенциалами [$\lambda_{2,0}$ $\lambda_{2,2}$]. Свободная фракция моделировалась с $\tau_c=0.1$ нс при предположении изотропного движения. Таким образом, доля фракции со свободным вращением после фотолиза составляет примерно 14%.

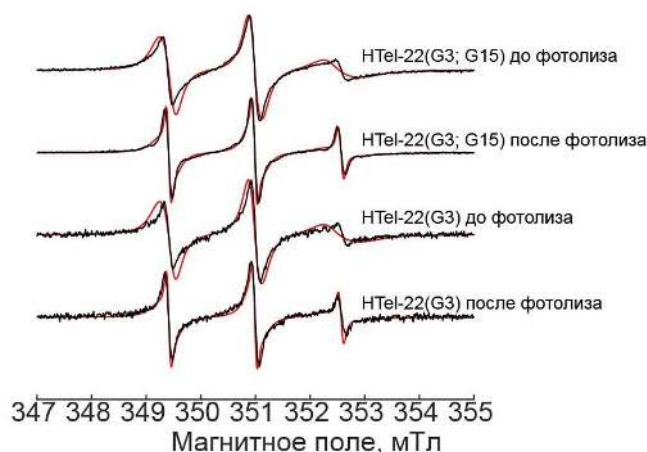


Рисунок 23. Спектры стационарного ЭПР комплексов ТМРyP4 с HTel-22(G3:G15) и HTel-22(G3) до фотолиза и после (черные линии), а также результаты их моделирования (красная линия).

Таблица 2. Параметры моделирования спектров стационарной ЭПР-спектроскопии, представленных на рисунке 23

Образец	A [A_{xx} A_{yy} A_{zz}], МГц	Ширина линий [Гаусс Лоренц], мТл	τ_c , нс	$[\lambda_{2,0}$ $\lambda_{2,2}]$	g-фактор	Вес фракции, %
До фотолиза	[16 16 104]	[0.05 0.05]	1.2	[0.7 -0.7]	[2.0083 2.0061 2.0022]	100
	[16 16 101]	[0.07 0.05]	0.1	[0 0]	[2.0086 2.0061 2.0022]	0
После фотолиза	[16 16 104]	[0.05 0.05]	1.2	[0.7 -0.7]	[2.0083 2.0061 2.0022]	86
	[16 16 101]	[0.07 0.05]	0.1	[0 0]	[2.0086 2.0061 2.0022]	14

Тем не менее, интенсивность сигнала нитроксильных меток после фотолиза достаточна, как и доля связанных с ДНК меток (84%), что позволяет делать достоверные выводы о структурных изменениях из-за фотолиза. Как было отмечено ранее, после фотолиза данные ДЭЭР для HTel-22 (G3; G15) демонстрируют появление расстояний в диапазоне от 3.5 до 5 нм, не соответствующих ни параллельным, ни антипараллельным структурам (рисунок 16). Такое увеличение расстояний между двумя нитроксильными метками указывает на разворачивание

структуры квадруплекса. Появление дополнительных больших расстояний в распределении порфирин-нитроксильный радикал после фотолиза также подтверждает это предположение (рисунок 20). В распределении по расстояниям сохраняется положение основного пика, но его ширина увеличивается за счет возникновения дополнительного вклада расстояний от 2 до 5 нм, что соответствует развороту квадруплекса в более объемную структуру.

Эффект светоиндуцированной дестабилизации квадруплексных структур ранее обнаружили авторы работы [3], в которой проводилось исследование тромбин-связывающего аптамера в комплексе с ТМРyP4. Однако для НТел-22 ранее о таком эффекте не сообщалось. Таким образом, впервые представлена экспериментально подтвержденная фотоиндуцированная дестабилизация квадруплексных структур НТел-22 в комплексе с ТМРyP4.

2.3.5 Димерные структуры НТел-22

Помимо разворачивания G-структуры, данные ДЭЭР для моно-меченой производной НТел-22 демонстрируют образование димерных структур после фотолиза, процент которых можно определить, анализируя глубину модуляции (рисунок 24).

При отсутствии димеров дипольные модуляции во временных зависимостях отсутствуют. Однако во временных зависимостях присутствует низкоамплитудная модуляция как для свободного НТел-22, так и для его комплекса с ТМРyP4 до облучения. При экспериментальных условиях, используемых в исследовании, максимальное значение λ для пары нитроксильных радикалов составляет 24%. Учитывая это, а также 80%-ную эффективность спинового мечения для НТел-22(G3), доля димеров до фотолиза составляет примерно $\frac{3 \cdot 100}{24 \cdot 0,8} = 15,6 \pm 5\%$. Для оценки процента димерных структур после фотолиза важно учитывать фотодеградацию спиновых меток (20%) и уменьшении количества связанных меток с НТел-22 (15%), что в сумме означает уменьшение концентрации связанных нитроксильных радикалов на 35%. В результате, по аналогичным расчетам доля димерных структур после фотолиза увеличилась до $\frac{4,5 \cdot 100}{24 \cdot 0,8 \cdot 0,65} = 36 \pm 5\%$. Это значение служит верхней границей оценки количества образовавшихся димеров.

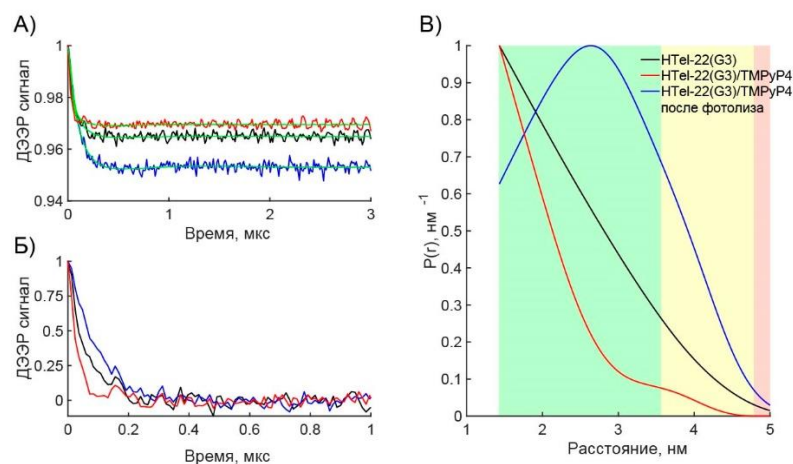


Рисунок 24. Эксперименты ДЭЭР моно-меченной производной HTel-22(G3) до и после фотоллиза. А) Временные зависимости после коррекции базовой линии и результаты их моделирования (зеленые линии). Б) Нормированные на глубину модуляции временные зависимости. В) Нормированные на глубину модуляции распределения по расстояниям. Различными цветами указаны диапазоны достоверности: зеленая область-достоверна форма распределения, желтая- достоверно среднее значение и ширина распределения, красная-только среднее значение.

Определение точной структуры димеров исключительно на основе ДЭЭР экспериментов с использованием одного сайта введения нитроксильной спиновой метки и без каких-либо структурных моделей представляет собой сложную задачу. Более того, наблюдаемое распределение расстояний для димеров охватывает широкий диапазон, что указывает на возможное существование разнообразных структур и/или образование слабо упорядоченных конфигураций. Хотя на данном этапе исследования невозможно корректно определить структуру димеров, сам факт того, что их количество значительно возрастает после фотоллиза, является важным результатом. На данный момент существует лишь одна опубликованная работа, где было обнаружено увеличение доли димеров HTel-22 в комплексе с TMPyP4, что дополнительно подчеркивает уникальность полученных результатов [177]. В этом исследовании авторы изучили структуру комплекса HTel-22/TMPyP4 до и после облучения. Используя методы малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и нейтронов, они выявили процесс димеризации HTel-22, который был индуцирован связыванием порфирина с квадруплексом и усиливался под действием света. Авторы продемонстрировали, что HTel-22 изначально существует в мономерной форме, однако образование комплекса с TMPyP4 приводит к формированию димеров, составляющих около 60% от общей популяции. В отличие от упомянутого результата, полученные нами данные демонстрируют иную картину. Доля димеров не изменяется при связывании с TMPyP4 и при этом не превышает 15%. Возможной причиной расхождений результатов являются различия в

используемых концентрациях, так как исследования, описанные в данной главе, проводились при относительно низкой (более приемлемой для биологических систем) концентрации НТел-22 – 50 мкМ, что в десять раз меньше концентрации ДНК, использованной в исследовании [177]. Хотя наши и предыдущие исследования расходятся в некоторых аспектах, оба исследования подчеркивают значительное увеличение доли димеров НТел-22 после облучения комплекса. Эти данные крайне важны для углубления понимания взаимодействий между G-квадруплексами и порфиринами под действием света, что открывает новые пути для оптимизации использования производных порфирина в фотодинамической терапии.

2.4 Заключение

В данной главе продемонстрирован потенциал импульсной дипольной и светоиндуцированной ЭПР-спектроскопии как метода, позволяющего получать детальную структурную информацию о комплексах G-квадруплексов ДНК с фотоактивными лигандами. Представленный подход дополняет существующие биофизические методы, такие как ЯМР-спектроскопия и рентгеноструктурный анализ, и дает уникальные возможности для мониторинга динамических изменений топологии G-квадруплексов под действием света, а также для определения локализации фотосенсибилизатора в таких комплексах.

На примере теломерной ДНК-последовательности НТел-22, образующей G-квадруплекс в присутствии ионов калия, показано, что данная структура в комплексе с лигандом существует в равновесии параллельной и антипараллельной топологий. Применение фотосенсибилизатора ТМРур4 позволило выявить позиции его связывания на G-квадруплексе, включая ранее только теоретически предсказанный, но экспериментально не подтвержденный участок АРТ2, расположенный на нижней тетраде антипараллельной формы.

Проведенные фотохимические эксперименты с использованием ЭПР-спектроскопии продемонстрировали, что облучение комплекса НТел-22/ТМРур4 приводит к двум ключевым структурным перестройкам: разворачиванию исходной G-квадруплексной структуры и увеличению доли димерных форм. Количественный анализ показал, что фотооблучение в течение одного часа приводит к увеличению доли димеров с $16 \pm 5 \%$ до $36 \pm 5 \%$.

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. 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.

ГЛАВА 3. МЕТОДЫ ДИПОЛЬНОЙ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ С ФОТОВОЗБУЖДЕННЫМИ МЕТКАМИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ТЕТРАПИРРОЛЬНЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

3.1 Введение

Определение сайтов связывания между биомолекулами и лигандами играет ключевую роль в фармакологии, поскольку позволяет разрабатывать лекарственные препараты, избирательно воздействующие на специфические участки мишени, что повышает их эффективность и снижает риск побочных эффектов [251, 252]. Кроме того, информация об локализации сайтов связывания лигандов имеет важное значение для понимания молекулярных механизмов действия лекарств и механизмов формирования лекарственной устойчивости [253, 254].

В данной главе продемонстрирован потенциал дипольной ЭПР-спектроскопии как высокоинформативного метода для построения детальной карты сайтов связывания фотоактивных лигандов различной природы с человеческим сывороточным альбумином. Представленные результаты показывают, что данный подход позволяет не только идентифицировать все доступные участки связывания, но и оценить их относительную заселенность, а также выявить влияние структуры лиганда на аффинность конкретных сайтов. Результаты, описанные в этой главе, опубликованы в [255].

3.2 Экспериментальная часть

Коммерчески TSPР, TCPPР, TMRyP4 были приобретены у компании Cayman Chemical (США) с чистотой 95%. Все коммерчески доступные ФС использовались без дополнительной очистки. 5,15-ди(п-карбоксифенил)порфирин (DCPPР), а также катионные пиридилзамещенные порфирины–5,10,15,20-тетракис(4-(4-пиридил-п-бутаноил)оксифенил)порфирин тетрабромид (C3Pу) и 5,10,15,20-тетракис(4-(6-пиридил-п-гексаноил)оксифенил)порфирин тетрабромид (C5Pу) были синтезированы в РТУ МИРЭА к.х.н. Ждановой К. А и д.х.н. Брагиной Н. А.

Очищенный от жирных кислот ЧСА был приобретен у Sigma–Aldrich. Синтез альбумина, меченного нитроксильным радикалом (ЧСА-НИТ), проводили по адаптированной методике, описанной в [12]. Выход спин-меченного ЧСА составил ~95%. Для приготовления комплексов ФС с спин-меченным альбумином готовили стоковый раствор ФС в диметилформамиде с концентрацией 5 мМ. Раствор ФС разбавляли до 0.4 мМ в 10 мМ фосфатносолевом буфере,

содержащем 0.4 мМ ЧСА (ЧСА-НИТ), и интенсивно перемешивали в течение 5 мин. Перед ЭПР-экспериментами в раствор добавляли глицерол-d8 в объемном соотношении 1:1. После приготовления все образцы немедленно помещали в предварительно охлажденный резонатор.

Временные зависимости, полученные методом ФИМД спектроскопии, регистрировали с использованием следующей импульсной последовательности: лазерная вспышка-задержка после лазерной вспышки- $\pi/2$ - τ - π - τ -эхо, где длительность π импульса составляла 20 нс. Задержка перед вспышкой увеличивалась с шагом 8 нс. Измерения проводили при положении поля, соответствующем максимуму спектра нитроксильного радикала при 30 К. Общее время накопления сигнала составляло 10–12 часов. Распределения расстояний были получены с использованием программы DeerAnalysis 2022 DEERNet Spinach SVN Rev 5662. Все зарегистрированные сигналы ФИМД спектроскопии демонстрировали дипольную модуляцию с достаточной глубиной, а соответствующие распределения расстояний, полученные с помощью подхода DEERNet, показали различные распределения для всех исследуемых фотосенсибилизаторов. Диапазон временной зависимости (3.5 мкс) позволил достоверно определить расстояния между спинами в исследуемых комплексах в диапазоне от 10 до 60 ангстрем.

Молекулярный докинг и оптимизация структуры с помощью молекулярной динамики были выполнены в лаборатории ЭПР-спектроскопии МТЦ СО РАН м.н.с. Колоколовым М.И.

3.3 Результаты и обсуждение

Поскольку ЧСА в плазме крови подвергается воздействию различных редокс-активных веществ, тиольная группа альбумина Cys34 изначально не полностью свободна [256, 257]. Коммерчески доступный ЧСА обычно содержит не более 30% свободных SH-групп, что значительно ограничивает эффективность спинового мечения [258]. Для повышения эффективности спинового мечения сначала было проведено мягкое восстановление Cys34: 0.4 мл (0.3 мМ) раствора ЧСА в фосфатно-солевом буфере (10 мМ фосфата натрия, 140 мМ NaCl, 2.68 мМ KCl, pH 7.4) смешивали с 20 мкл 1.3-кратного избытка дитиотреитола (ДТТ), растворенного в том же буфере, и инкубировали при 37°C в течение 20 минут, постоянно перемешивая. Сразу после восстановления низкомолекулярные продукты реакции были убраны методом центрифужной фильтрации с использованием концентраторов Centricon с отсечением по молекулярной массе 30 кДа. Такие мягкие условия селективно восстанавливают Cys34, сохраняя целостность внутримолекулярных дисульфидных связей [211, 213].

После этапа восстановления Cys34 300 мкл (0.5 mM) раствора ЧСА смешивали с пятикратным избытком спиновой метки (метантиосульфонатный радикал) и инкубировали при 37°C в течение ночи при перемешивании. Избыток непрореагировавшей метки был убран с использованием концентраторов. Окончательные образцы для экспериментов дипольной ЭПР-спектроскопии готовили с использованием калиевого буфера в D₂O (2 mM KН₂РO₄, 10 mM K₂НРO₄, 140 mM KCl, pH 7.4).

На рисунке 25 представлены спектры стационарной ЭПР-спектроскопии ЧСА-НИТ (спиновой производной ЧСА с нитроксильной меткой, введенной в Cys34), а также их моделирование с предварительным восстановлением -SH групп и без него. Полученные спектры практически идентичны и хорошо согласуются с ранее опубликованными данными для альбумина, спин-меченного по Cys34 нитроксильным радикалом [261, 262]. Во время моделирования спектров было сделано предположение о наличии двух иммобилизованных медленно вращающихся фракций и свободной метки, параметры моделирования приведены в таблице 3. В предыдущих исследованиях два компонента, соответствующие медленному вращению, связывали с различными конформациями кармана Cys34, где локализуется нитроксильная метка [262]. Важно отметить, что такой же двухкомпонентный спектр наблюдается не только для ЧСА, выделенного из плазмы крови [262], но и для рекомбинантного ЧСА [261, 263], что указывает на то, что эти две спектральные фракции являются внутренним свойством сайта Cys34, а не следствием происхождения или подготовки образца. Идентичные спектры, полученные нами как с предварительным восстановлением тиольной группы Cys34, так и без него, дополнительно подтверждают, что использованная мягкая обработка ДТТ не изменяет место присоединения метки или равновесные конформационные состояния кармана Cys34.

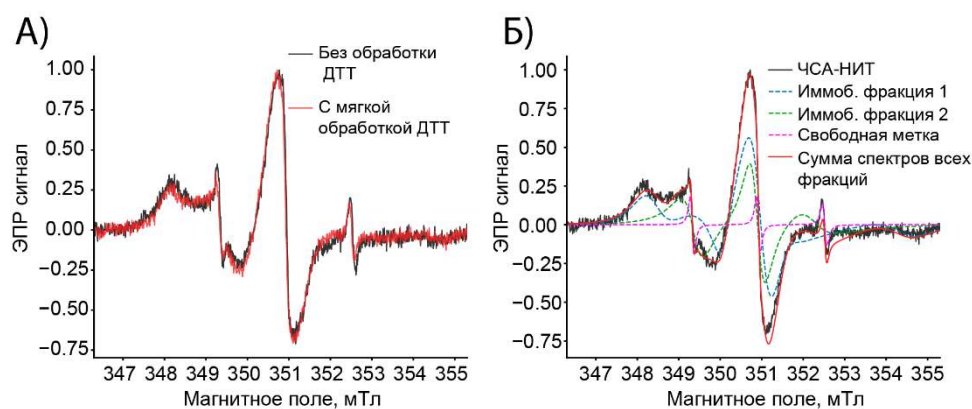


Рисунок 25. А) Спектры стационарной ЭПР-спектроскопии ЧСА-НИТ с предварительной обработкой ДТТ и без нее. Б) Результаты моделирование спектров ЧСА-НИТ.

Таблица 3. Параметры моделирования спектров стационарной ЭПР-спектроскопии, представленных на рисунке 25. Моделирование проводилось с использованием программного пакета Easyspin v6[264].

Фракция	Вес, %	τ_c , нс	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	$[A_{xx} A_{yy} A_{zz}]$, МГц
Иммоб. фракция 1	70	7.6	2.0088	2.0055	2.0021	14 14 105
Иммоб. фракция 2	30	2.2	2.0088	2.0055	2.0032	14 14 108
Свободная метка	1	0.059	2.009	2.006	2.0025	14 14 107

В работе были изучены комплексы альбумина с фотосенсибилизаторами, различающимися по заряду, размеру и гидрофобности (рисунок 26). Исходя из известных констант связывания фотосенсибилизаторов с альбумином, доля связанных лигандов при использованных концентрациях составила 80–90% (таблица 4).

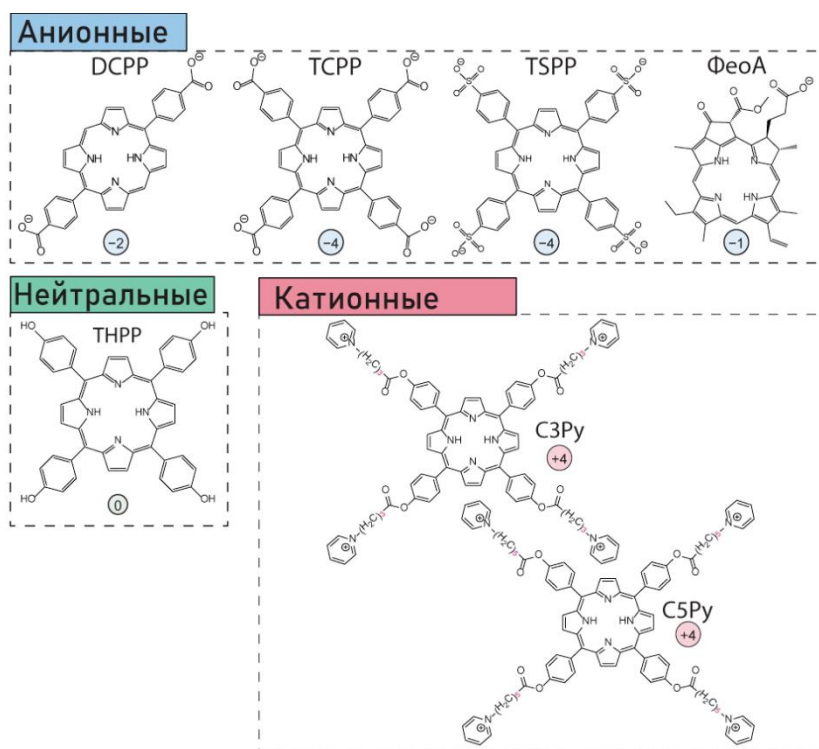


Рисунок 26. Химические структуры исследуемых фотосенсибилизаторов с указанием общего молекулярного заряда при pH 7.0 (обозначен в кружках).

Таблица 4. Константы связывания K_c исследуемых соединений с человеческим сывороточным альбумином.

Порфирин	K_c, M^{-1}	Ссылка на литературу
Анионные		
TSPP	$3-5 \times 10^6$	[265]
ФеоА	2.6×10^7	[266]
Нейтральные		
THPP	1.5×10^5	[267]
Катионные		
TMPPyP4	9100	[268]
C5Py	6400	Измерено соавторами

Оптические спектры всех исследуемых соединений в комплексе с альбумином представлены на рисунке 27. Все соединения демонстрируют различные формы спектров поглощения. При длине волны возбуждения лазерными импульсами в экспериментах дипольной ЭПР-спектроскопии (532 нм) ОП для всех соединений отлична от 0, что означает эффективную генерацию триплетного состояния при этой длине волны.

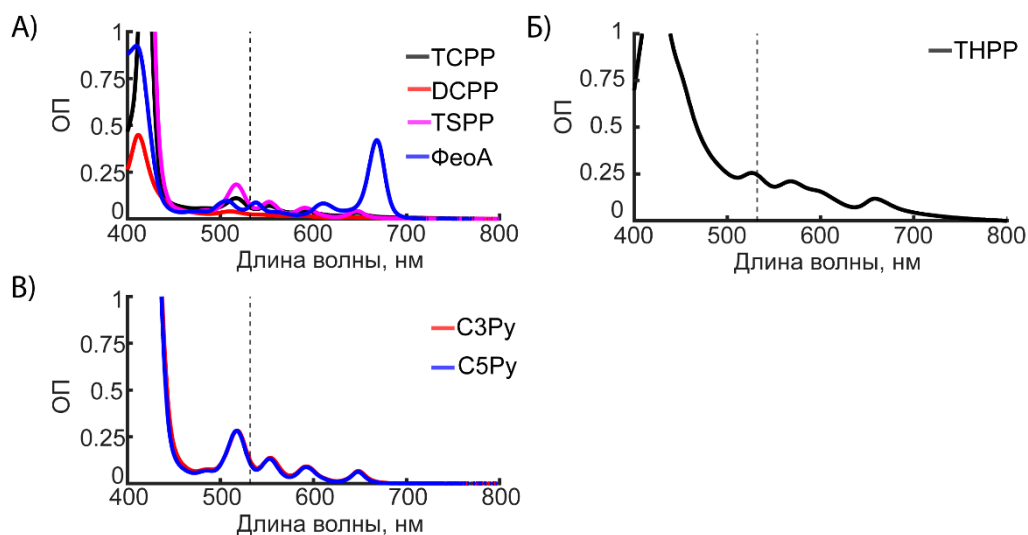


Рисунок 27. Спектры поглощения всех исследованных комплексов альбумина с ФС. А) Спектры комплексов с анионными ФС. Б) Спектры комплексов с нейтральными ФС. В) Спектры комплексов с катионными ФС. Концентрация альбумина и ФС составляла 0.2 мМ. Длина оптического пути – 1 мм. Пунктирной вертикальной линией обозначена длина волны возбуждения лазерными импульсами в экспериментах дипольной ЭПР-спектроскопии.

3.3.1 Анионные порфирины

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 (рисунок 28), а также определены относительные вклады каждого пика, что позволяет оценивать заселенность соответствующих сайтов связывания (рисунок 29). В качестве примера алгоритма обработки данных рассмотрим порфирин ТСРР. Экспериментальное распределение для ТСРР содержит два пика: доминирующий широкий пик при 3.8 нм и слабоинтенсивный пик при 2.8 нм с вкладами 0.9 и 0.1 соответственно. С помощью моделирования также было рассчитано средние расстояния от центров кластеров до нитроксильной метки, учитывая все возможные конформации метки. Для ТСРР доминирующий пик при 3.8 нм хорошо соответствует двум близко расположенным кластерам, находящимся в пространстве между субдоменами ПА и ША вблизи входа в сайт Садлоу I.

На рисунке 30 показаны места связывания всех исследуемых анионных соединений. Часто предполагается, что анионные фотосенсибилизаторы связываются в сайтах гема или Садлоу I, исходя из их химического сходства с гем-порфирином и общей аффинности этих сайтов к анионным лигандам [185, 195, 269, 270]. Эти предположения лежат в основе интерпретации данных метода тушения флуоресценции Trp214 альбумина [195, 196, 197]. Однако недавние исследования показали, что при связывании лигандов в нескольких сайтах данные этого метода часто интерпретируются ошибочно [194, 271]. С помощью молекулярного докинга в сочетании с данными ЭПР-спектроскопии было показано, что для всех анионных соединений оба сайта (гема и Садлоу I) участвуют в связывании одновременно, однако их относительная аффинность существенно зависит от структуры лиганда. Возможность делать такие выводы без априорных предположений подтверждает валидность нашего исследования и отличает его от предыдущих.

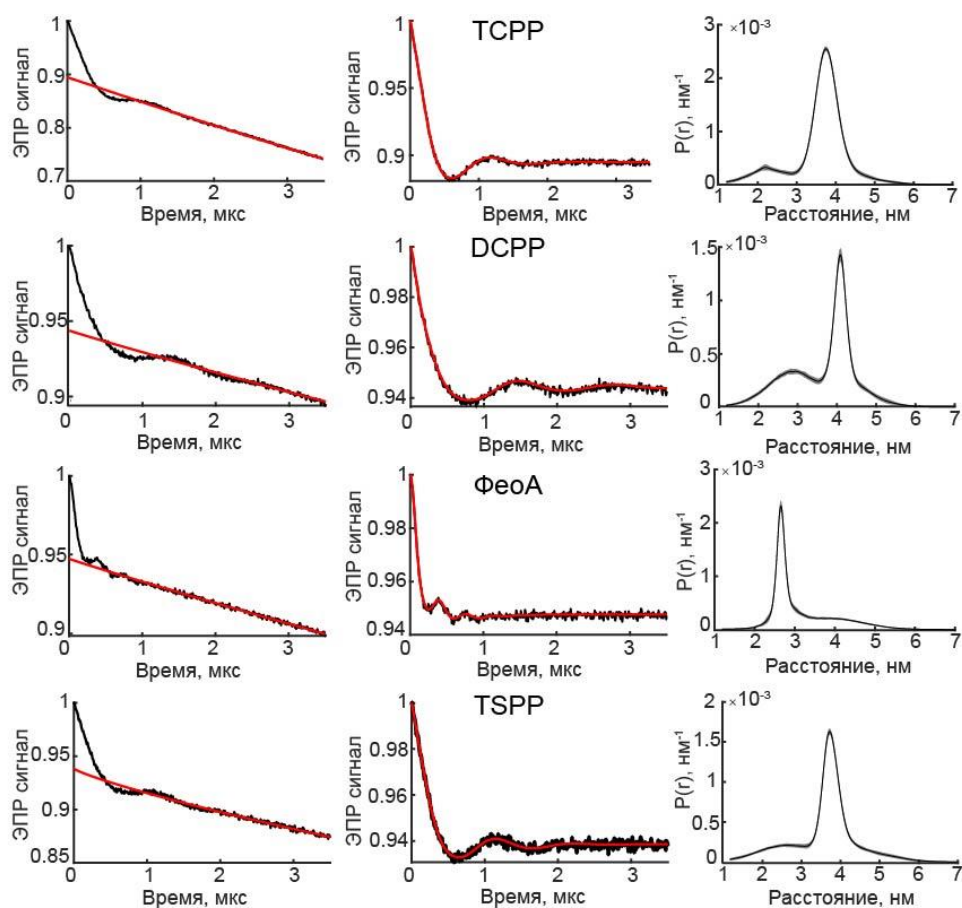


Рисунок 28. Измерение расстояний методом ФИМД спектроскопии в Q-диапазоне для комплекса ЧСА с различными анионными фотосенсибилизаторами. Слева показаны временные зависимости (черные линии) до вычитания базовой линии (красная линия), в центре показаны временные зависимости (черные линии) и результаты их моделирования (красная линия), справа соответствующие распределения по расстояниям с соответствующими диапазонами ошибки (серые области).

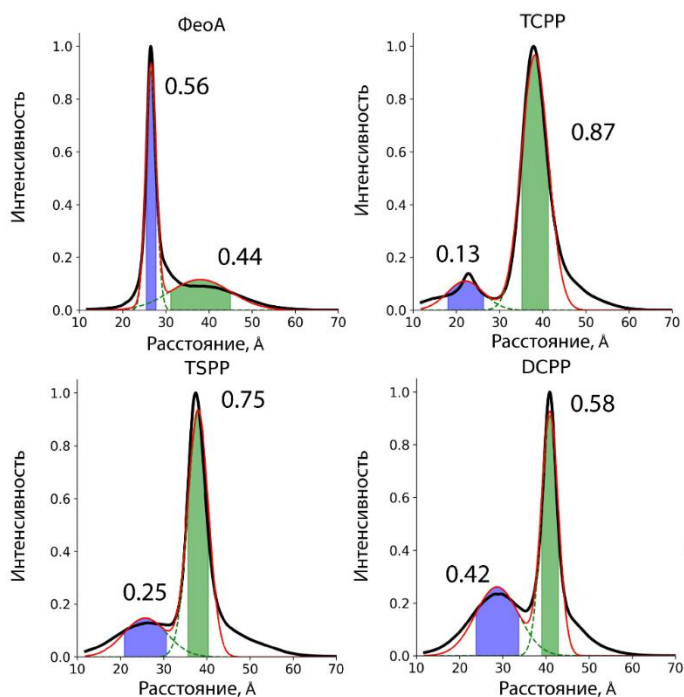


Рисунок 29. Аппроксимация распределения расстояний для анионных ФС гауссовыми функциями. Зеленый пунктир – форма отдельных пиков. Красная сплошная линия – сумма всех аппроксимированных пиков. Закрашенные области – интегральные площади под каждым пиком. Границы областей для интегрирования выбраны в пределах $\pm\sigma$ для каждого гауссова распределения. Относительные вклады пиков (интеграл одного пика, нормированный на общий интеграл всех пиков) указаны сверху распределений.

Для ФеоА основным сайтом связывания оказался сайт гема (пик при 2.6 нм), что ожидаемо из-за его структурного сходства с анионными порфиринами. Из-за небольшого размера ФеоА может полностью входить в небольшой карман альбумина, где сильные электростатические взаимодействия обеспечивают высокоаффинное связывание с сайтом гема. Кроме того, форма кармана белка идеально соответствует форме ФеоА, как "ключ к замку". Хотя ФеоА также связывается с альбумином в сайте Садлоу I, его популяция в этом сайте практически исчезает, когда соотношение концентраций ФеоА:ЧСА снижается (рисунок 31). Таким образом, сайт Садлоу I является менее предпочтительным сайтом связывания для ФеоА. Таким образом, взаимодействие между ФС и ЧСА зависит от их относительного соотношения. Поскольку в данном исследовании использовалось только соотношение концентраций 1:1 для всех других ФС, результаты могут отличаться при других соотношениях.

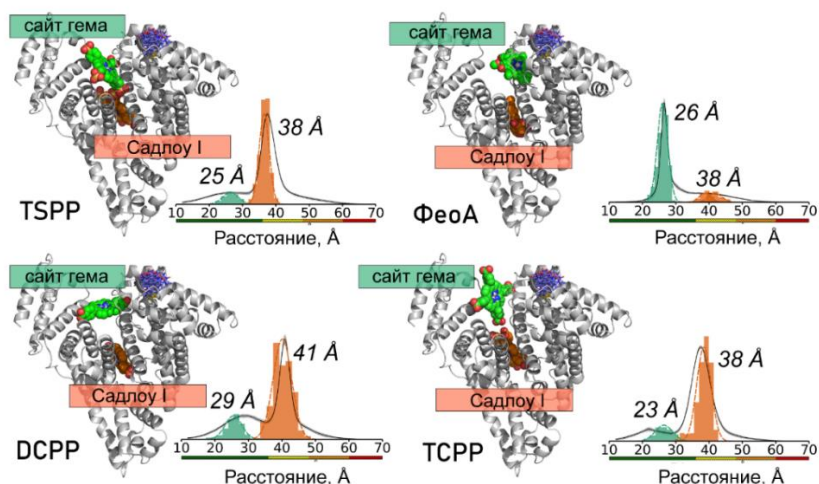


Рисунок 30. Структуры исследованных комплексов ЧСА/анионные ФС. Для каждого соединения слева показаны предсказанные структуры комплексов альбумин-фотосенсибилизатор, а также позы докинга, демонстрирующие лучшую корреляцию с экспериментальными данными. Справа представлены экспериментальные распределения 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: зеленый - форма распределения достоверна, желтый - среднее значение и ширина достоверны, оранжевый - среднее значение достоверно, красный - количественная оценка невозможна.

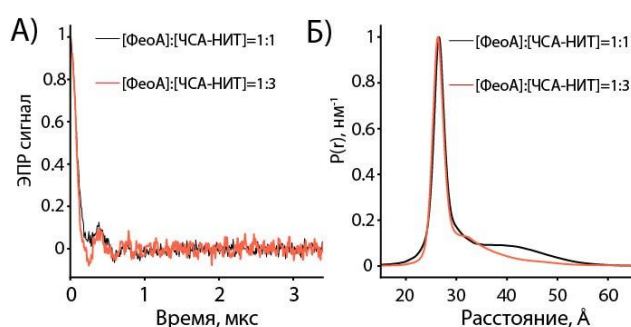


Рисунок 31. Временные зависимости после вычета базовой линии (А), а также распределения расстояний, полученные методом ФИМД, для комплекса ЧСА/ФеоА при различных соотношениях концентраций. Концентрация ЧСА составляла 0.2 мМ, как и в других экспериментах, в то время как концентрация ФеоА варьировалась.

Большой размер порфиринов с периферическими группами (TSPP, DCPP и TCPP) по сравнению с ФеоА препятствует их полному проникновению в сайт гема. Вместо этого основным

местом связывания становится сайт Садлоу I, известный своей способностью адаптироваться к крупным лигандам [272]. Молекулярный докинг не учитывает этот факт, ошибочно предсказывая сайт гема в качестве основного. Это подчеркивает уникальную способность ЭПР одновременно детектировать все сайты связывания и определять их относительную популяцию заселенности лигандом.

Кроме того, TCPP и TSPP, несмотря на различия в молекулярной структуре, обладают почти одинаковыми популяциями в сайте гема. Популяция DCPP в сайте гема в два раза больше, чем TCPP. DCPP и TCPP имеют наибольшие размеры среди всех исследованных ФС. Однако DCPP содержит только две периферические группы по сравнению с четырьмя у TCPP. Этот малый по сравнению с TCPP размер позволяет DCPP принимать более оптимальную ориентацию для взаимодействия с сайтом гема.

Результаты, описанные в данной главе, не полностью согласуются с предсказанной локализацией TSPP в ранее опубликованной работе [196]. Предложенное ранее положение подразумевало бы расстояние между TSPP и спиновой меткой Cys34 около ~5 нм, что не подтверждается данными ЭПР. Тем не менее, с помощью предложенного нами подхода было показано, что SO_3^- находится на расстоянии 8 Å от Trp214. Это скорректированное положение хорошо согласуется с ранее наблюдаемым тушением флуоресценции триптофана. В исследовании [231] был предсказан сайт связывания TSPP с использованием исключительно слепого докинга: на поверхности домена III. Однако этот вывод противоречит как более ранним флуоресцентным данным в работе [196], так и нашим результатам ЭПР, что подчеркивает необходимость экспериментальной проверки предсказаний молекулярного моделирования. Таким образом, нами была получена более точная и экспериментально подтвержденная модель сайта связывания TSPP с альбумином.

3.3.2 Нейтральные и катионные порфирины

Распределение расстояний для THPP характеризуется значительной шириной, что указывает на широкий спектр конфигураций при связывании (рисунок 32, рисунок 33, рисунок 34): доминирующий пик при 2.8 нм вкладом 0.58 и широкий пик при 5 нм с вкладом 0.42. Такая большая ширина указывает на высокую подвижность или наличие нескольких областей связывания. Основной пик при 3 нм представлен двумя кластерами: один на поверхности между субдоменами IB и IIA и один рядом с сайтом гема. Кроме того, были обнаружены три возможные области связывания на поверхности альбумина: одна вблизи сайта Садлоу II и две других - рядом с сайтом связывания жирных кислот FA6. Эти дополнительные сайты связывания для THPP не являются типичными для взаимодействия порфиринов с альбумином, что затрудняет их предсказание на основе существующих знаний.

Ранее в исследованиях локализация ТНРР предсказывалась с использованием флуоресцентных методов и процедур докинга [195]. Поза, полученная методом молекулярного докинга в работе [195], располагается в домене III, близко к одному из сайтов, идентифицированных нами с помощью ЭПР, с предсказанным расстоянием до спиновой метки около 4.4 нм, что достаточно хорошо согласуется с нашими экспериментальными результатами. Однако важно отметить, что предыдущее исследование выявило только один сайт связывания и не учитывали режим связывания по нескольким позициям, четко продемонстрированный данными ЭПР. Более того, предложенный авторами сайт связывания не соответствует доминирующему сайту вблизи области связывания гема, наблюдаемому в ЭПР-исследовании. Как упоминалось ранее, ФРПЭ спектроскопия может давать неточную информацию в случаях связывания по нескольким сайтами одновременно. Вероятно, это является основной причиной расхождений между нашими данными и ранее опубликованными результатами.

Применяя новый подход, были получены уникальные данные о структуре комплексов альбумина с катионными порфиринами. Как и в случае ТНРР, катионные порфирины также демонстрируют широкие распределения расстояний (рисунок 32, рисунок 33, рисунок 34). В распределениях расстояний для C3Py и C5Py вершины пиков расположены на схожих расстояниях, хотя и с несколько различающимися популяциями. Это свидетельствует о том, что, несмотря на разную длину периферических групп, их сайты связывания находятся близко друг к другу и расположены на поверхности альбумина, что ожидаемо, учитывая его значительный отрицательный заряд [273]. Доминирующий сайт находится на субдомене IV вблизи остатка Cys34 с пиком при 2.1–2.2 нм. Пик при 5 нм соответствует сайту на поверхности субдоменов IIА-IIВ, пересекающемуся с сайтом FA6. Средняя часть распределения не может быть однозначно отнесена к одному сайту и описывается тремя возможными локализациями: между субдоменами IV и IIВ вблизи сайта гема, на поверхности субдомена IA вблизи сайта связывания жирных кислот FA2, и на поверхности субдоменов IIА и IIIА, где "хвост" порфиринов находится близко к сайту FA6. Кроме того, уширение пиков в экспериментальном распределении указывает на высокую подвижность, что подтверждается методами молекулярной динамики.

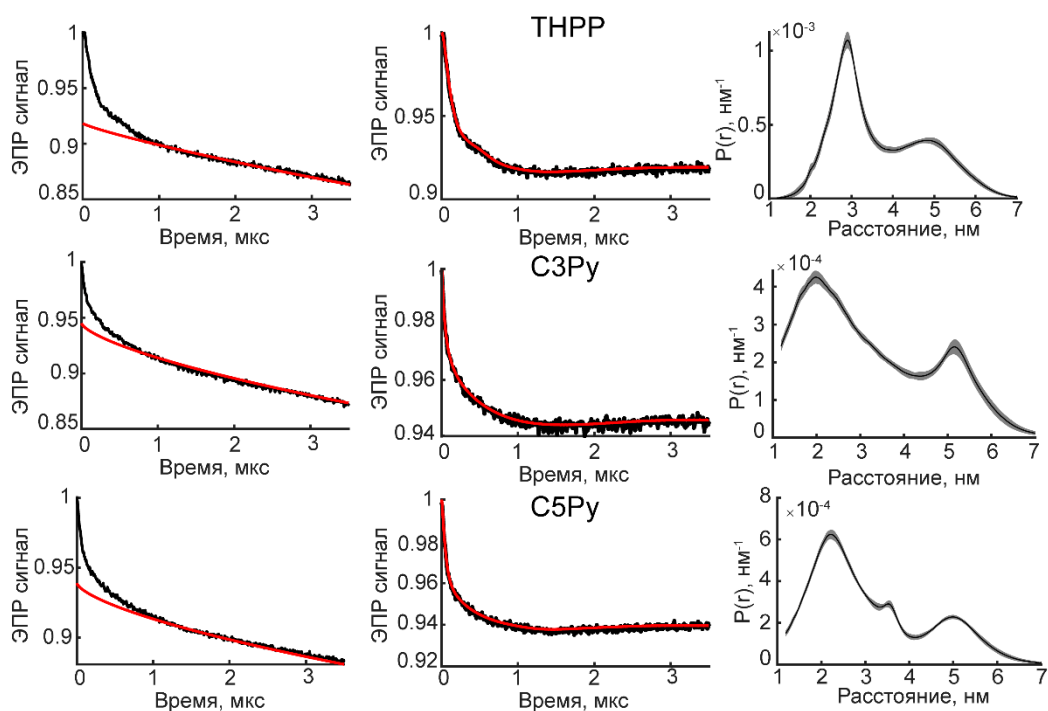


Рисунок 32. Измерение расстояний методом ФИМД спектроскопии в Q-диапазоне для комплекса ЧСА с нейтральным (THPP) и катионными (C3Py, C5Py) фотосенсибилизаторами. Слева показаны временные зависимости (черные линии) до вычитания базовой линии (красная линия), в центре показаны временные зависимости (черные линии) и результаты их моделирования (красная линия), справа соответствующие распределения по расстояниям с диапазонами ошибки (серые области).

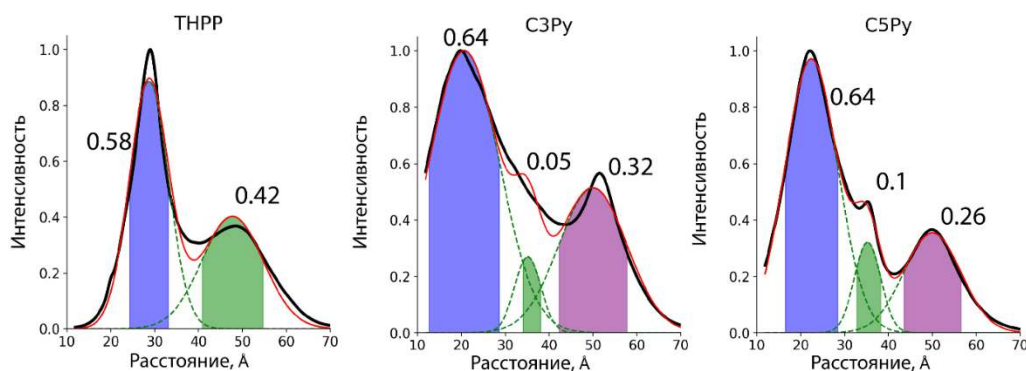


Рисунок 33. Аппроксимация распределения расстояний для нейтральных, катионных ФС гауссовыми функциями. Зеленый пунктир – форма отдельных пиков. Красная сплошная линия – сумма всех аппроксимированных пиков. Закрашенные области – интегральные площади под каждым пиком. Границы областей для интегрирования выбраны в пределах $\pm\sigma$ для каждого гауссова распределения. Относительные вклады пиков (интеграл одного пика, нормированный на общий интеграл всех пиков) указаны сверху распределений. Распределения для катионных ФС аппроксимированы тремя гауссовыми функциями, для нейтрального ФС - двумя.

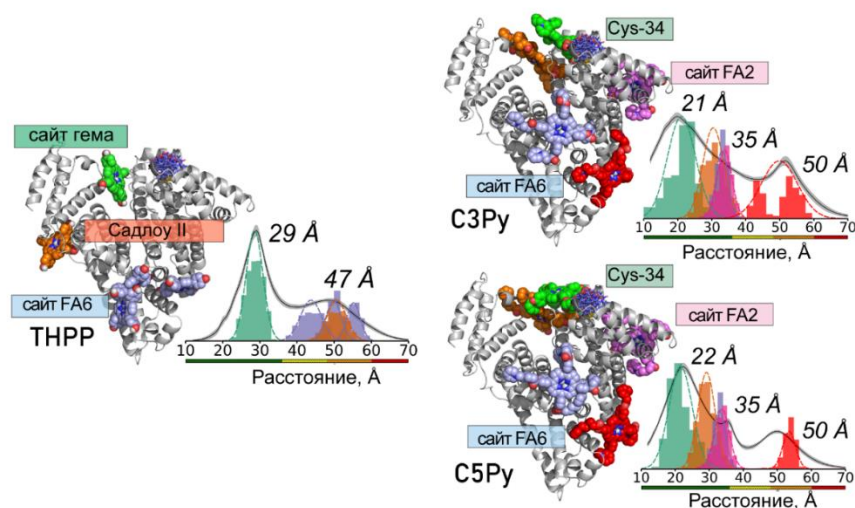


Рисунок 34. Структуры исследованных комплексов ЧСА/нейтральные или катионные ФС. Для каждого соединения слева показаны предсказанные структуры комплекса альбумин/ФС, а также позы докинга, демонстрирующие лучшую корреляцию с экспериментальными данными. Справа представлены экспериментальные распределения 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.

Структурная информация о связывании катионных фотосенсибилизаторов с альбумином крайне скудна, вероятно, потому что эти лиганды связываются далеко от Trp214, что делает флуоресцентный анализ по тушению Trp214 малочувствительным к их связыванию. Впервые с помощью дипольной ЭПР-спектроскопии мы продемонстрировали разнообразное связывание катионных порфиринов с альбумином по множеству позиций.

3.4 Заключение

Результаты, представленные в данной главе, демонстрируют, что светоиндуцированная дипольная ЭПР-спектроскопия позволяет одновременно регистрировать все сайты связывания фотоактивных лигандов с белками и оценивать их относительные заселенности. Установлено, что тетрапиррольные фотосенсибилизаторы различного зарядового состояния формируют комплексы с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) по нескольким сайтам связывания, включая как традиционные участки (Садлоу I и гем-сайт), так и нетипичные области, ранее не выявленные другими методами.

На основе полученных данных впервые была построена экспериментально подтвержденная карта сайтов связывания фотоактивных лигандов с ЧСА. Для всех исследованных анионных соединений (включая ФеоА, 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.

Так, для малого по размеру лиганда ФеоА доминирующим участком связывания является гем-сайт. Благодаря компактной структуре и электростатическим взаимодействиям, ФеоА может полностью входить в соответствующий карман, формируя высокоаффинный комплекс. Взаимодействие с участком Садлоу I при этом гораздо слабее и практически исчезает при снижении отношения ФеоА:ЧСА. В отличие от этого, 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.

Основной сайт для нейтрального порфирина THPP локализован вблизи гем-сайта. Дополнительно, для THPP были выявлены потенциальные нетипичные участки связывания: вблизи сайта Садлоу II и в области, прилегающей к участку связывания жирных кислот FA6.

Для катионных порфиринов (C3Py и C5Py) 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 остатка Cys34.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что связывание фотосенсибилизаторов с альбумином происходит по нескольким позициям 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. 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.

ГЛАВА 4. ПРИМЕНЕНИЕ ИМПУЛЬСНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДИНАМИЧЕСКОЙ РАЗВЯЗКИ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ МНОЖЕСТВЕННЫХ ЭХО- СИГНАЛОВ В ДИПОЛЬНОЙ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ С ФОТОВОЗБУЖДЕННЫМИ ТРИПЛЕТНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ

4.1 Введение

Использование спиновых меток, переходящих в триплетное состояние под действием света, имеет ряд достоинств, однако часто сопряжено с лимитирующим фактором — невозможностью использовать высокую частоту повторения лазерных импульсов. Данное ограничение диктуется как аппаратными возможностями лазеров, так и физико-химической природой самих меток. В этой связи актуальным становится поиск методов, позволяющих усилить амплитуду полезного сигнала в импульсном ЭПР, особенно когда эксперимент вынужденно проводится в режиме медленного накопления данных.

В настоящей 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–Парселла–Мейбума–Гилл), при его применении в экспериментах дипольной ЭПР-спектроскопии с фотовозбужденными триплетными состояниями. Результаты, описанные в данной главе, опубликованы в [79, 274].

4.2 Экспериментальная часть

Синтез диады C_{60} ТАМ был описан в публикации [4]. C_{60} ТАМ (рисунок 35) растворяли в толуоле в концентрациях 120 мкМ или 24 мкМ. Раствор C_{60} ТАМ помещали в кварцевые трубки (внешний диаметр 1.7 мм, внутренний 1.1 мм) объемом 3 мкл для экспериментов в Q-диапазоне и в кварцевые трубки (внешний диаметр 2.8 мм, внутренний 1.8 мм) объемом 10 мкл для экспериментов в X-диапазоне. ТМРyP4 приобретен у Sigma-Aldrich Chem. Стоковый раствор ТМРyP4 в диметилформамиде готовили в концентрации 5 мМ. Перед измерениями раствор ТМРyP4 разбавляли до 0.05 мМ в 10 мМ фосфатном буфере (KH_2PO_4 и K_2HPO_4 в H_2O или D_2O , pH 7.4) и интенсивно перемешивали. Перед ЭПР-экспериментами добавляли глицерол-h8 (или глицерол-d8) в объемном соотношении 1:1. Растворы ТМРyP4 помещали в кварцевые трубки объемом 10 мкл.

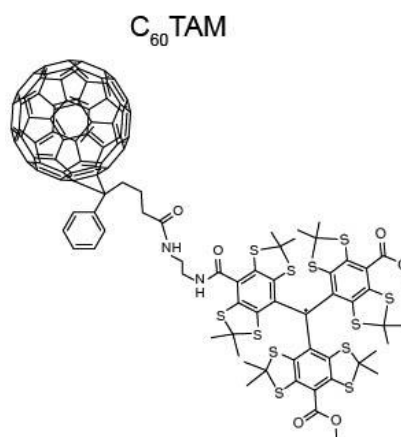


Рисунок 35. Химическая структура C₆₀TAM.

Измерения проводили на импульсном ЭПР-спектрометре Bruker Elexsys E580 с резонаторами ER 4118X-MD5 для X-диапазона, EN5107D2 для Q-диапазона при 30 К.

В работе был использован следующий вариант КПМГ-блока: $\{\tau-(\pi)_{x-\tau-\text{эхо}}-\tau-(\pi)_{x-\tau-\text{эхо}}\}_N$. Во всех экспериментах применяли двухступенчатый фазовый цикл $[+x, -x]$ для первого $\pi/2$ -импульса для коррекции базовой линии (рисунок 36).

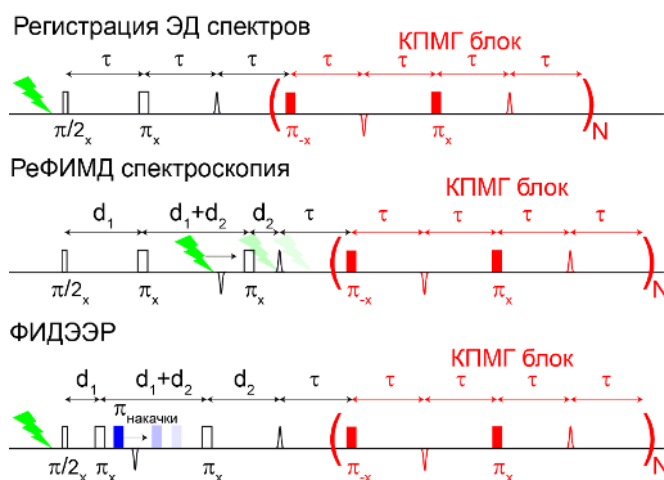


Рисунок 36. Импульсные последовательности, использованные в данной главе.

Регистрации временных зависимостей спада рефокусированных эх проводились с использованием следующей последовательности, представленной на рисунке 36. Длительность π -импульса – 20 нс, задержка после вспышки – 1000 нс, $\tau = 310$ нс для C_{60} ТАМ и $\tau = 370$ нс для ТМРyР4. Магнитное поле устанавливалось на максимум ЭД спектра ЭПР для C_{60} ТАМ и на максимум эмиссионной компоненты для ТМРyР4. Для каждого образца определялось оптимальное время между импульсами в КПМГ(τ), при котором достигается максимальное отношение сигнал/шум. Общее число сканов – 1, количество усреднений на 1 измерение составило 100. Спектры ЭД регистрировались с той же последовательностью и параметрами, но

с усреднением по 10 измерений на точку. Развертка поля составляла 150 мТл (500 точек) для ТМРур4 и 40 мТл (400 точек) для С₆₀ТАМ.

Эксперименты ФИДЭЭР в X-диапазоне с блоком КПМГ проводились на диаде С₆₀ТАМ. Использовались следующие задержки: $d_1 = 200$ нс, $d_2 = 1000$ нс, $\tau = 240$ нс, усреднение по 10 измерений на точку. Блок КПМГ содержал 29 π -импульсов. Длительность накачивающего импульса – 36 нс, наблюдающих импульсов $\pi/2$ и π – 10 и 20 нс соответственно. Разница частот между накачивающим (ν_1) и наблюдающими импульсами (ν_2) составляла 113 МГц, накачивающий импульс устанавливался на максимум ЭД спектра ТАМ. Шаг изменения положения накачивающего импульса – 4 нс. Общее число сканов – 2.

Эксперименты РеФИМД спектроскопии в Q-диапазоне также проводились на С₆₀ТАМ. Q-диапазон выбран из-за более высокой чувствительности к стабильным радикалам по сравнению с X-диапазоном. Временные задержки составляли $d_1 = 1000$ нс, $d_2 = 350$ нс, $\tau = 350$ нс, количество усреднений в каждой точке 10. Задержка перед лазерной вспышкой увеличивалась с шагом 4 нс. Измерения проводились при положении поля, соответствующем максимуму ЭД спектра ТАМ. Общее число сканов – 2.

Эксперименты по измерению времени поперечной релаксации (релаксационные зависимости) проводились с последовательностью: $(\pi/2)-d_1-(\pi)-(d_1)$ –эхо с увеличением задержки d_1 с 300 нс. Длительности импульсов: $\pi/2$ – 10 нс, π – 20 нс, регистрация по 1 измерению на точку. Общее число сканов – 3.

Использование последовательностей КПМГ на коммерческих импульсных ЭПР-спектрометрах Bruker сопряжено с рядом технических ограничений. Во-первых, большинство стандартных систем поддерживает интегрирование только одного эха, в то время как КПМГ эксперименты требуют интегрирования множества эх в пределах одной импульсной последовательности. Единственным возможным решением является запись полных временных зависимостей сигналов вместе со всеми сигналами спинового эха с последующей независимой обработкой данных. Однако при работе спектрометра в режиме записи временных зависимостей (осциллограмм) скорость накопления данных существенно снижается по сравнению с ожидаемой для заданного времени повторения последовательностей (со временем «SRT» между импульсными последовательностями, которое определяет пользователь программного обеспечения Bruker). В частности, было установлено, что внутренний цифровой преобразователь спектрометра SpecJetII в режиме записи переходных процессов получает триггеры счета с интервалом 1.6 с, даже при установке меньших значений SRT. В результате выигрыш в чувствительности от интегрирования множества эх нивелировался потерями, связанными с

замедлением измерений, что делает применение схемы детекции КПМГ на многих коммерческих ЭПР-спектрометрах в стандартной конфигурации нерациональным.

Для преодоления этого ограничения был использован внешний высокоскоростной АЦП Spectrum M4i.2211-x8 (Spectrum, Германия) вместо стандартного SpecJetII. Данная модификация не требует изменений внутренней структуры ЭПР-спектрометра или стандартного управляющего программного обеспечения. Для реализации достаточно перенаправить два сигнальных и один триггерный кабель от SpecJetII к внешнему АЦП, либо просто подключить преобразователи последовательно при согласовании входных импедансов. В проведенных экспериментах параметры импульсных последовательностей и другие настройки спектрометра задавались через программное обеспечение Bruker Xcp, тогда как внешний АЦП управлялся на отдельном компьютере с помощью открытого программного обеспечения Atomize, разработанного к.х.н. Мельниковым А. Р. в лаборатории ЭПР-спектроскопии МТЦ СО РАН. Непосредственная запись данных, их усреднение и визуализация двумерных экспериментальных данных также осуществлялись в Atomize с использованием скрипта, где количество запусков синхронизировалось с программным обеспечением Bruker.

Во всех экспериментах с использованием КПМГ блока временные зависимости ЭПР-сигналов сохранялись и обрабатывались следующим образом: производилась коррекция базовой линии, фазы с последующим интегрированием. Ширина окна интегрирования определялась по первому эху для достижения наилучшего отношения сигнал/шум (ОСШ) и затем применялась ко всем остальным.

Огибающая рефокусированных эх в полученных временных зависимостях, а также релаксационные зависимости аппроксимировались функцией $I(t) = A \exp(-(t/T)^p)$, где T соответствует $T_{\text{КПМГ}}$ при аппроксимации огибающей временной зависимости рефокусированных эх, и T соответствует T_m (время фазовой памяти) при аппроксимации релаксационных зависимостей.

Эксперименты времяразрешенной ЭПР-спектроскопии проводили при температурах 80 К, при этом катионные порфирины растворяли в диметилформамиде в концентрации 15 мМ. Перед каждым измерением концентрированные растворы порфиринов разбавляли до концентрации 250 мкМ и помещали в кварцевые ампулы (внешний диаметр 3.8 мм, внутренний диаметр 2.8 мм) в объеме 40 мкл. Перед помещением в резонатор образцы подвергали шоковой заморозке в жидком азоте. Лазерное возбуждение проводили с использованием второй гармоники импульсного лазера Nd:YAG Lotis ТП (532 нм) с частотой повторения 10 Гц. Излучение на выходе лазера с помощью системы поворотных призм заводили через окно резонатора. Средняя мощность лазерного импульса перед окном составляла 15–20 мДж; этого было достаточно, чтобы возбудить

все молекулы порфирина в образце. Эксперименты ЭПР проводили на самодельном спектрометре, собранном на базе Bruker EMX, оборудованном системой охлаждения жидким азотом (77–300 K). Шаг по полю для всех времяразрешенных ЭПР-спектров составлял 0.4 мТл, количество измерений в каждой точке 30, сканов 3. Из каждой временной зависимости вычитали временную зависимость, записанную в нерезонансном поле (100 мТл). Моделирование спектров выполняли с помощью пакета Easyspin для Matlab.

4.3 Результаты и обсуждение

4.3.1 Сравнение эффективности применения блоков динамической развязки

Рассмотрим добавление КПМГ блока к двухимпульсной последовательности Хана и сравним эффективность рефокусирования когерентности для фотовозбужденных триплетных состояний S_{60} и TMRyP4 относительно стабильного радикала ТАМ. На рисунке 37 представлены временные зависимости, полученные при применении КПМГ блока с оптимальными задержками между импульсами ($\tau=310$ нс, 370 нс и 350 нс для S_{60} , TMRyP4 и ТАМ соответственно). 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. На рисунке 37 также показаны огибающие рефокусированных эх и T_m - зависимости. Все исследуемые спиновые системы демонстрируют схожие времена фазовой релаксации T_m (3–4 мкс) в протонированном окружении. Значение p , показатель в аппроксимации T_m - зависимостей, превышает единицу для всех исследуемых спиновых систем (таблица 5), что свидетельствует о значительном вкладе механизма диффузии ядерных спинов растворителя в декогеренцию электронных спинов.

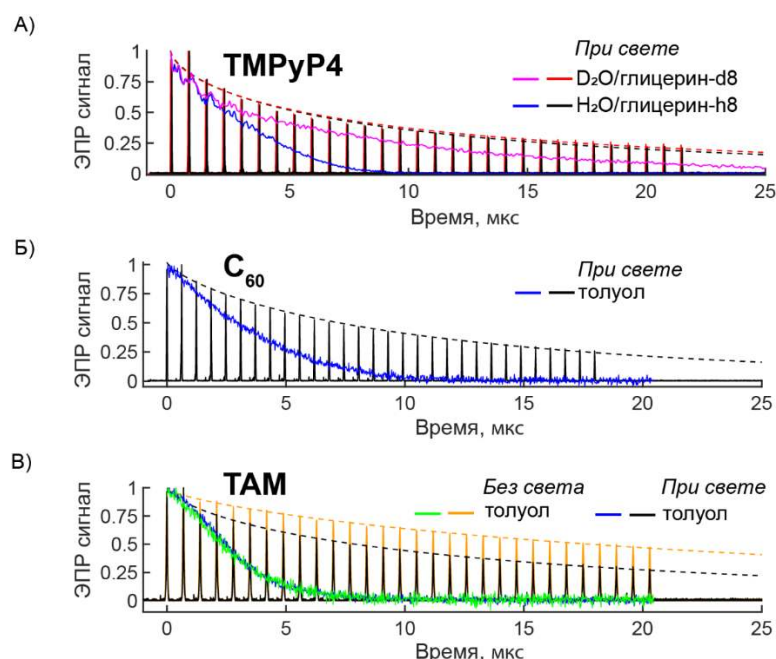


Рисунок 37. Нормированные модули временных зависимостей, зарегистрированных при фотовозбуждении триплетных состояний ТМРyР4 и С₆₀ТАМ с использованием блока КПМГ. А) Эффективность применения КПМГ блока для ТМРyР4 в различных растворителях. Б) Эффективность применения КПМГ блока для С₆₀. В) Эффективность применения КПМГ блока для ТАМ в диаде С₆₀ТАМ 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 сплошными линиями со следующим цветовым кодом: ТМРyР4 в D₂O/глицерол -d8 (А, пурпурная), ТМРyР4 в H₂O/глицерол -h8 (А, синяя), С₆₀ (Б, синяя), ТАМ (В; при свете – синяя, без света – зеленая).

Таблица 5. Значения времен T_m (время фазовой релаксации), $T_{\text{КПМГ}}$ и показателя p для исследуемых спиновых меток в присутствии и отсутствии фотовозбуждения С₆₀ или ТМРyР4. 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
С 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
ТМРyР4	H ₂ O/глицерол-h8	Вкл.	3.8/1.4	9.5/0.6
ТМРyР4	D ₂ O/глицерол-d8	Вкл.	8.4/1.00	10.0/0.6

Известно, что применение КПМГ блоков наиболее эффективно для подавления ядерной спиновой диффузии [135, 275]. С целью сравнения эффективности применения КПМГ для различных меток огибающие рефокусированных эх аппроксимировались экспоненциальной функцией, аналогично анализу T_m , полученные параметры приведены в таблице 5. Применение КПМГ существенно увеличивает время спада интенсивности эха по сравнению с двухимпульсной последовательностью Хана, однако оказывает различное влияние на фотовозбужденные триплетные состояния и стабильные радикалы. В протонированной матрице КПМГ последовательность замедляет спад эха примерно в 2.5 раза для триплетного состояния S_{60} и ТМРуР4. Несмотря на различие в величинах параметров РНП для S_{60} и ТМРуР4 примерно на порядок, значения $T_{\text{КПМГ}}$ для этих спиновых систем оказались схожими. Для ТМРуР4 значение T_m увеличивается при замене протонированной матрицы растворителя на дейтерированную, что связано с подавлением механизма спиновой диффузии в ядерной подсистеме. В то же время, такое изотопное замещение не влияет на $T_{\text{КПМГ}}$, поскольку применение КПМГ наиболее эффективно уменьшает декогеренцию, вызванную именно механизмом ядерной спиновой диффузии.

В отсутствие фотовозбуждения применение КПМГ существенно увеличивает время спада эха ТАМ в диаде S_{60} ТАМ: $T_{\text{КПМГ}}$ в этом случае достигает 29 мкс. Однако $T_{\text{КПМГ}}$ уменьшается до 13 мкс при включении лазерных импульсов и возбуждении партнера S_{60} . Фотовозбуждение триплетного состояния S_{60} не влияет на значение T_m ТАМ, а также этот эффект не связан с нагревом образца от лазерного излучения. Следовательно, наблюдаемый эффект обусловлен светоиндуцированным появлением спина партнера и, как следствие, появлением диполь-дипольного взаимодействия в диаде. Поскольку T_m стабильного радикала примерно в 10 раз меньше $T_{\text{КПМГ}}$, можно предположить, что партнер-индуцированное влияние на релаксацию незначительно для T_m , но существенно для $T_{\text{КПМГ}}$ для ТАМ.

Кроме того, несмотря на существенно различные значения РНП для триплетных состояний S_{60} и ТМРуР4, их значения $T_{\text{КПМГ}} \sim 10$ мкс оказались сравнительно близкими, но заметно меньшими, чем $T_{\text{КПМГ}} \sim 30$ мкс для ТАМ без света. Поскольку S_{60} и ТАМ, являясь компонентами одной диады, находятся в одинаковом окружении растворителя, это указывает, что РНП триплетного состояния действительно вносит вклад в электронную декогеренцию при применении КПМГ блоков.

Если окна интегрирования для всех эх одинаковы, уровень шума должен возрасти пропорционально квадратному корню из общего числа суммируемых эх n . В этом случае общий выигрыш ОСШ для КПМГ_n (γ_n) можно определить следующим образом:

$$\gamma_n = \frac{I_n \sigma_1}{\sigma_n I_1} = \frac{1}{\sqrt{n}} \frac{I_n}{I_1} = \frac{1}{\sqrt{n}} \frac{\sum_{i=1}^n I(t_i)}{I_1}, \quad (29)$$

где:

- $I(t_i) = I_i$ - индивидуальные интегральные интенсивности эх
- I_1 - интегральная интенсивность первого эха
- I_n - интегральная интенсивность n эх
- σ_1 и σ_n - стандартные отклонения шума после интегрирования первого и n эх соответственно

Добавление интеграла каждого последующего эха приводит к выигрышу ОСШ только до тех пор, пока накопленный сигнал растет быстрее шума. Поскольку сигнал уменьшается с характерным временем $T_{\text{КПМГ}}$, существует оптимальное значение n, выше которого ОСШ начинает уменьшаться. На рисунке 38 представлена зависимость выигрыша в ОСШ (ОСШ при суммировании интегралов n эх, нормированное на ОСШ, полученное в результате интегрирование только первого эха) от числа интегрируемых эх. Полученные зависимости демонстрируют заметное увеличение ОСШ с ростом n как для фотовозбужденного триплетного состояния ТМРур4, так и для С₆₀: γ_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 последовательности, поэтому не удалось экспериментально максимизировать выигрыш ОСШ для ТАМ. Тем не менее, на основе значения $T_{\text{КПМГ}}$ теоретический максимум для ТАМ составляет 4.1 при 60 п-импульсах. Однако из-за диполь-дипольного взаимодействия с фотовозбужденным триплетным состоянием С₆₀ внутри диады, выигрыш ОСШ для ТАМ снижается до 3.

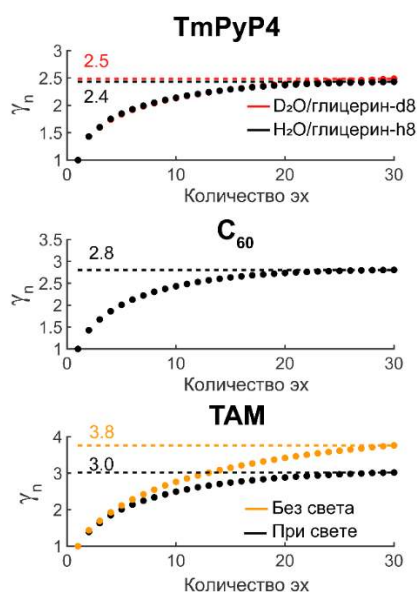


Рисунок 38. Выигрыш в отношении сигнал/шум (ОСШ) γ_n в зависимости от числа просуммированных эх. Все данные нормированы на ОСШ при $n=1$.

Таким образом, применение КПМГ блоков продемонстрировало заметную эффективность и может быть использовано для повышения чувствительности в ЭПР-экспериментах с триплетными состояниями фотоиндуцированных меток.

Амфифильные *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. Однако регистрируемый ЭПР-сигнал таких порфиринов существенно ниже, чем для модельного ТМРyP4. Введение терминальных пиридиновых группировок на коротких алкильных спейсерах может значительно повлиять на параметры РНП, и подход с применением КПМГ блоков может оказаться неэффективным. В работе [79] были исследован ряд катионных *мезо*-арилзамещенных порфиринов и их металлокомплексов с Zn. С помощью времяз разрешенной ЭПР-спектроскопии были зарегистрированы спектры фотовозбужденного триплетного состояний порфиринов (рисунок 39), а также с помощью моделирования были определены параметры РНП и относительные заселенности триплетных подуровней. Параметры моделирования приведены в таблице 6. Таким образом, было показано, что введение пиридиновых заместителей через алкильные спейсеры не приводит к значительным изменениям параметров РНП порфиринов, следовательно, не влияет на конфигурацию их триплетного состояния. Введение цинка в порфирины C3Py и C5Py вызывает изменение спектральной картины и смену типа поляризации, что связано с изменением заселенностей 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 пиридиновых заместителей через алкильные спейсеры не оказывает существенного влияния на электронную структуру триплетного состояния комплекса порфирина с цинком.

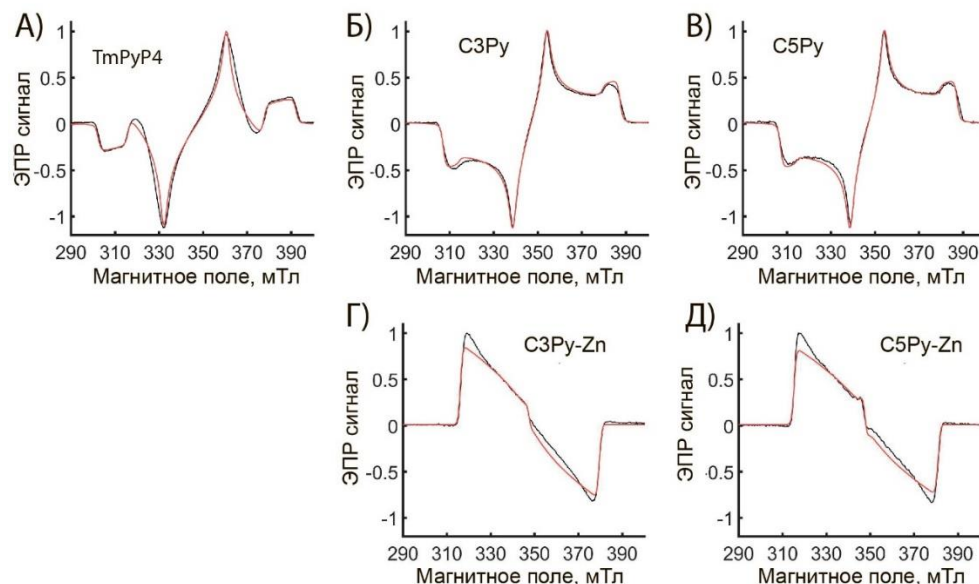


Рисунок 39. Спектры времяразрешенной ЭПР-спектроскопии триплетных состояний катионных порфиринов, зарегистрированные при 80 К в диметилформамиде: А) ТМРурР4, Б) СЗРур, В) С5Рур, Г) СЗРур-Зн, Д) С5Рур-Зн. Черным цветом показаны экспериментальные данные, красным цветом показаны результаты моделирования.

Описанные выше результаты подчеркивают, что подход с применением КПМГ блоков может быть использован не только для модельного порфирина ТМРурР4, но и для различных порфириновых производных, при этом можно ожидать аналогичный или даже больший выигрыш в ОСШ.

Таблица 6. Параметры моделирования спектров, представленных на рисунке 39

Порфирин	$ D $, МГц	$ E $, МГц	Относительная заселенность триплетных подуровней $p_x : p_y : p_z$
C3Py	1125	230	0.4 : 1 : 0
C5Py	1125	230	0.4 : 1 : 0
C3Py-Zn	890	292	0 : 0 : 1
C5Py-Zn	925	300	0 : 0 : 1
TMPyP4	1260	155	0.65 : 1 : 0.6
TPP [80, 276]	1120	221	

4.3.2 Применение блоков КПМГ к регистрации эхотекстируемых спектров

На рисунках 40, 41 представлены ЭД спектры TMPyP4 и C₆₀, полученные с применением КПМГ блоков. Интенсивность ЭД спектров увеличивается в ~1.5-3 раза при использовании блока КПМГ₃₀ по сравнению с интегрированием только первичного эха. При увеличении n форма спектров как для C₆₀, так и для TMPyP4 существенно искажается, что обусловлено ориентационной зависимостью времени спада сигнала $T_{\text{КПМГ}}$. Аналогичные искажения спектров можно ожидать и для других фотоиндуцируемых меток, триплетные состояния которых обладают большими параметрами РНП.

На рисунках 40,41 также показаны экспериментальные значения ОСШ для ЭД спектров при разных n и расчетные значения ОСШ, полученными с использованием уравнения (29). Экспериментально полученный ОСШ практически соответствует расчетному, достигая $\gamma_n=2.3-2.6$ при $n=30$.

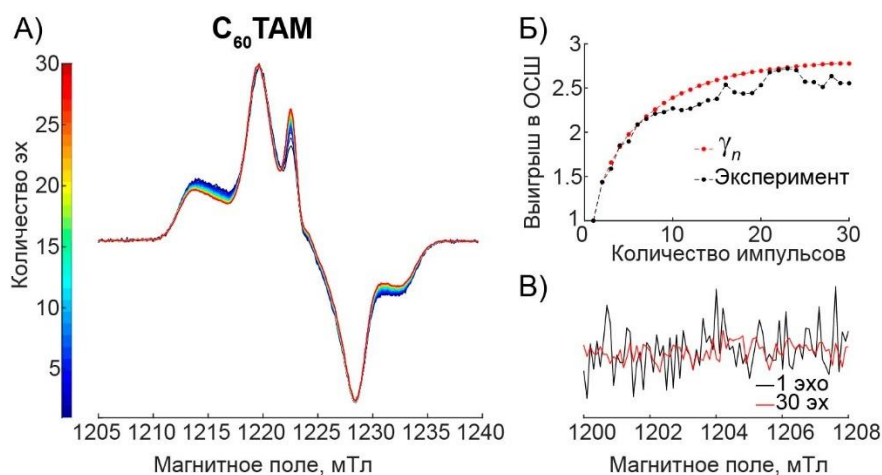


Рисунок 40. Эксперименты регистрации ЭД спектров для $C_{60}TAM$ в толуоле, проведенные с использованием КПМГ_n-блоков в зависимости от числа интегрированных эх n : А) ЭД спектры представлены в нормированном виде; цветовой код для числа просуммированных эх n указан слева. Б) Соответствующий выигрыш ОСШ в зависимости от n . В) Уровни шума нормированных ЭД спектров при 1 и 30 просуммированных интегралов эх.

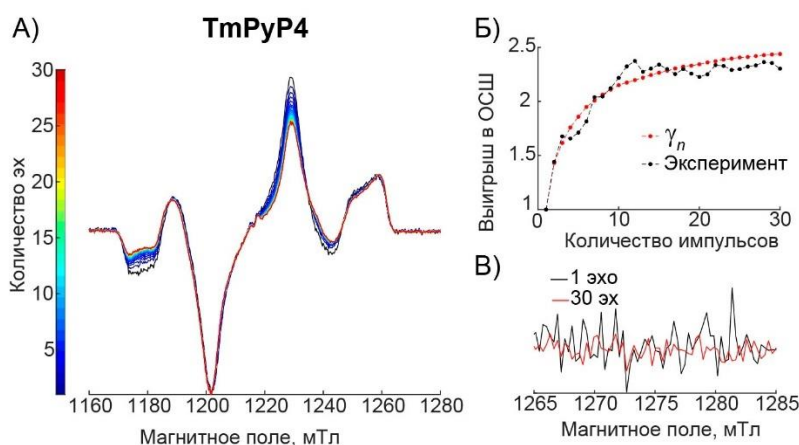


Рисунок 41. Эксперименты регистрации ЭД спектров для $TmPyP4$ в D_2O /глицерол- d_8 , проведенные с использованием КПМГ_n-блоков в зависимости от числа интегрированных эх n : А) ЭД спектры представлены в нормированном виде; цветовой код для числа просуммированных эх n указан слева. Б) Соответствующий выигрыш ОСШ в зависимости от n . В) Уровни шума нормированных ЭД спектров при 1 и 30 просуммированных интегралов эх.

4.3.3 Применение блоков КПМГ к экспериментам дипольной ЭПР-спектроскопии

Существует несколько вариантов импульсных последовательностей для измерения величины дипольного взаимодействия с использованием фотовозбужденных триплетных состояний. В данной работе была реализована схема применения КПМГ в двух основных вариантах: ФИДЭЭР и РеФИМД спектроскопия. Для оценки выигрыша от применения КПМГ

были проведены эксперименты дипольной ЭПР-спектроскопии с использованием диады C_{60} ТАМ, которая обладает оптимальными свойствами для обоих методов. В ФИДЭЭР сигнал триплетного состояния C_{60} регистрировался в X-диапазоне в зависимости от положения накачивающего импульса, который был приложен к радикалу ТАМ. В РеФИМД спектроскопии сигнал ТАМ регистрировался в Q-диапазоне, а триплетное состояние C_{60} выступало в роли спина накачки. В обоих методах КПМГ блок размещался как можно ближе к первому рефокусированному эху, формируемому в основной последовательности. Ожидаемые значения γ_n рассчитывались с использованием уравнения (29), где в качестве I_i была взята интенсивность сигнала временных зависимостей в нулевой момент времени. Значения γ_n возрастали с увеличением n для обоих методов, аналогично тенденциям, полученным ранее (рисунок 38, рисунок 42).

На рисунке 42 показаны временные зависимости ФИДЭЭР, полученные при интегрировании $n = 1, 6$ и 29 рефокусированных эх. Эти зависимости содержат одинаковую частоту модуляции, что свидетельствует об одинаковом распределении расстояний. Однако глубина модуляции меняется с ростом n : для ФИДЭЭР она уменьшается с 64% до 55%, а для РеФИМД спектроскопии - с 29% до 22%. Возможная причина - увеличение вклада интеграла стимулированных эх, накладывающихся на положения рефокусированных. Для учета этих изменений были рассчитаны скорректированные значения выигрыша ОСШ β_n с учетом абсолютных значений глубины модуляции λ_n при суммировании n эхо-сигналов:

$$\beta_n = \frac{1}{\sqrt{n}} \frac{\lambda_n}{\lambda_1}, \quad (30)$$

Даже после введения этой поправки ожидалось 2.3-кратное увеличение ОСШ для обоих методов (рисунок 42, В, синяя линия). Однако экспериментально определенные значения ОСШ, рассчитанные по реальному уровню шума во временных зависимостях, существенно отличались от ожидаемых. Было обнаружено, что уровни шума во временных зависимостях для $n=6$ и $n=29$ практически одинаковы. Хотя для ФИДЭЭР все же наблюдается выигрыш ОСШ в ~ 1.7 раз при $n=29$, для РеФИМД спектроскопии ситуация хуже - незначительное усиление всего в 1.3 раза при $n=5$. Такое существенное расхождение между расчетным и экспериментальным выигрышем ОСШ указывает на наличие дополнительных источников шума, не учтенных в текущей модели.

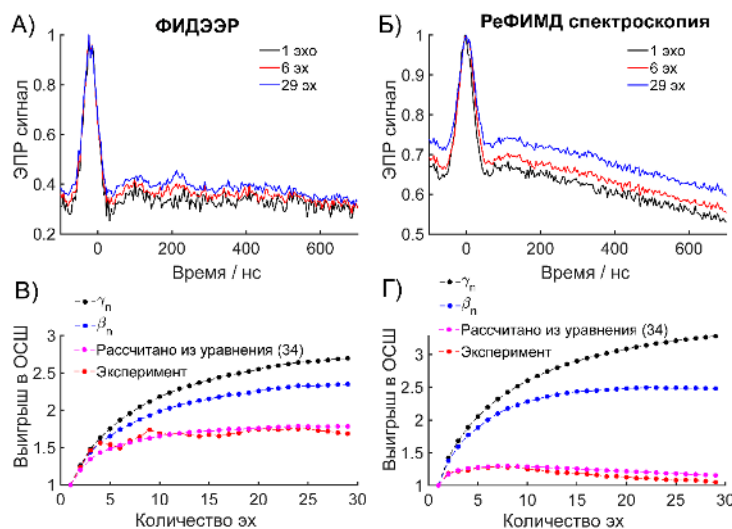


Рисунок 42. Эксперименты ФИДЭЭР и РеФИМД спектроскопии с использованием КПМГ_n-блоков (n=1-29) для C₆₀ТАМ в толуоле с концентрацией 120 мкМ. А, Б) Временные зависимости для разного числа просуммированных интегралов эх: n=1 (черная линия), n=6 (красная линия), n=29 (синяя линия). В, Г) Соответствующий выигрыш ОСШ в зависимости от n: Теоретические значения γ_n , рассчитанные по уравнению (29) (черная линия), скорректированные значения β_n с учетом глубины модуляции (уравнение (30)) (синяя линия), экспериментальный выигрыш ОСШ (красная линия), выигрыш ОСШ, рассчитанный из уравнения (34) (розовая линия).

4.3.4 Флуктуации мощности лазера как дополнительный источник шума

Важный аспект ЭПР-экспериментов с использованием лазерного возбуждения 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 эхо 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 C₆₀ в диаде C₆₀ТАМ. Поскольку глубина модуляции в РеФИМД спектроскопии относительно мала (~30%), в первом приближении можно предположить, что флуктуации интенсивности лазерных импульсов вызывают флуктуации значения общего интеграла n эх (I_n). Таким образом, дополнительный шум, вызванный изменением энергии

лазерного импульса ($\sigma_{\text{лазер}}$), можно выразить через относительное стандартное отклонение (ОСО) мощности лазерного импульса ($\varepsilon_{\text{лазер}}$) и значения общего интеграла п эх I_n :

$$\sigma_{\text{лазер}} = \varepsilon_{\text{лазер}} \times I_n, \quad (31)$$

Предполагая, что собственные шумы спектрометра $\sigma_{\text{спек}}$ и флуктуации лазерных импульсов $\sigma_{\text{лазер}}$ являются независимыми параметрами в экспериментах, общий уровень шума σ описывается следующим образом:

$$\sigma^2 = \sigma_{\text{лазер}}^2 + \sigma_{\text{спек}}^2, \quad (32)$$

В результате ОСШ при применении КПМГ определяется как:

$$\text{ОСШ}(n) = \frac{\lambda_n}{\sigma_n} = \frac{\lambda_n}{\sqrt{\sigma_{\text{лазер},n}^2 + \sigma_{\text{спек},n}^2}} = \frac{\lambda_n}{\sqrt{(\varepsilon_{\text{лазер},n} I_n)^2 + (\varepsilon_{\text{спек},n} I_n)^2}}, \quad (33)$$

где для удобства $\sigma_{\text{лазер}}$ выражено через ОСО спектрометра $\varepsilon_{\text{спек},n}$ и значения общего интеграла п эх I_n .

За один лазерный импульс может быть зарегистрировано несколько эх, следовательно, шум спектрометра может усредняться значительно быстрее, чем шум мощности лазерных импульсов. Согласно уравнению (33), даже относительно небольшой шум импульсов легко может стать ограничивающим фактором в значении итогового выигрыша ОСШ, который можно выразить следующим образом:

$$\frac{\text{ОСШ}(n)}{\text{ОСШ}(1)} = \frac{\beta_n \sqrt{(\varepsilon_{\text{лазер}})^2 + (\varepsilon_{\text{спек},1})^2}}{\gamma_n \sqrt{(\varepsilon_{\text{лазер}})^2 + \left(\frac{\varepsilon_{\text{спек},1}}{\gamma_n}\right)^2}}, \quad (34)$$

Таким образом, если для некоторого значения n выполняется условие $\varepsilon_{\text{лазер}} \gg \varepsilon_{\text{спек},1}/\gamma_n$, то выигрыш ОСШ перестает зависеть от n :

$$\frac{\text{ОСШ}(n)}{\text{ОСШ}(1)} = \frac{\beta_n \sqrt{(\varepsilon_{\text{лазер}})^2 + (\varepsilon_{\text{спек},1})^2}}{\gamma_n \varepsilon_{\text{лазер}}} = \text{const}, \quad (35)$$

Выражение (34) позволило проверить, является ли лазерный шум основной причиной значительно более слабого выигрыша ОСШ в экспериментах по сравнению с ожидаемым. Для этого был использован быстрый фотодиод (Thorlabs DET10C/M) для отслеживания мощности лазерных импульсов в каждой точке, синхронизированный с записью ЭПР-сигнала. Синхронизация обеспечивалась триггерными импульсами, поступающими с консоли спектрометра, а сигнал с детектора оцифровывался осциллографом SpecJetII. Интеграл профилей лазерных импульсов был записан с тем же

количеством усреднений на точку (10 раз), что и временные зависимости. В результате была получена зависимость энергии лазерных импульсов от времени, на основе которой было вычислено значение $\varepsilon_{\text{лазер}}$. Параметр $\varepsilon_{\text{спек,1}}$ определялся из анализа шумов во временных зависимостях.

В таблице 7 приведены полученные значения относительных уровней шума лазерных импульсов и спектрометра. С помощью уравнения (34) и полученных значений $\varepsilon_{\text{спек,1}}$ и $\varepsilon_{\text{лазер}}$, было рассчитано теоретическая зависимость выигрыша ОСШ от n с учетом всех источников шума. На рисунке 43 показано, что предсказание с помощью уравнения (34) хорошо соответствует экспериментальным значениям ОСШ(n). Действительно, в экспериментах не удалось достичь ожидаемого выигрыша ОСШ, поскольку при данных экспериментальных условиях параметр $\varepsilon_{\text{лазер}}$ сравним с $\varepsilon_{\text{спек,1}}/\gamma_n$.

Таблица 7. Параметры флуктуаций мощности лазерных импульсов ($\varepsilon_{\text{лазер}}$), уровень шума спектрометра ($\varepsilon_{\text{спек,1}}$), нормированный на γ_n , максимальное значение β_n , а также экспериментально полученные значения выигрыша ОСШ для всех экспериментов дипольной ЭПР-спектроскопии, проведенных с различными концентрациями C_{60}TAM в толуоле.

Эксперимент (концентрация C_{60}TAM , мкМ)	$\varepsilon_{\text{лазер}} \cdot 10^3$	$\frac{\varepsilon_{\text{спек,1}}}{\gamma_n} \cdot 10^3$	β_n	Эксп. выигрыш ОСШ
ФИДЭЭР (120)	7.1	7.2	2.4	1.7
РеФИМД спектроскопия (120)	5.2	2.1	2.5	1.3
ФИДЭЭР (24)	3.1	7.9	2.4	2.3
РеФИМД спектроскопия (24)	8.4	8.9	2.5	2.3

Для исключения влияния флуктуаций мощности лазерных импульсов на выигрыш в ОСШ при применении КПМГ должно выполняться $\varepsilon_{\text{лазер}} \ll \frac{\varepsilon_{\text{спек,1}}}{\gamma_n}$ при всех значениях n . Тогда получаемый выигрыш ОСШ будет выражаться как:

$$\frac{\text{ОСШ}(n)}{\text{ОСШ}(1)} = \beta_n, \quad (36)$$

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 ФИДЭЭР и РеФИМД спектроскопии концентрация спиновой системы C_{60}TAM была уменьшена 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 ФИДЭЭР за счет продолжительной (3 дня) работы лазера перед экспериментом. Временные зависимости, полученные при этих условиях, представлены на рисунке 43.

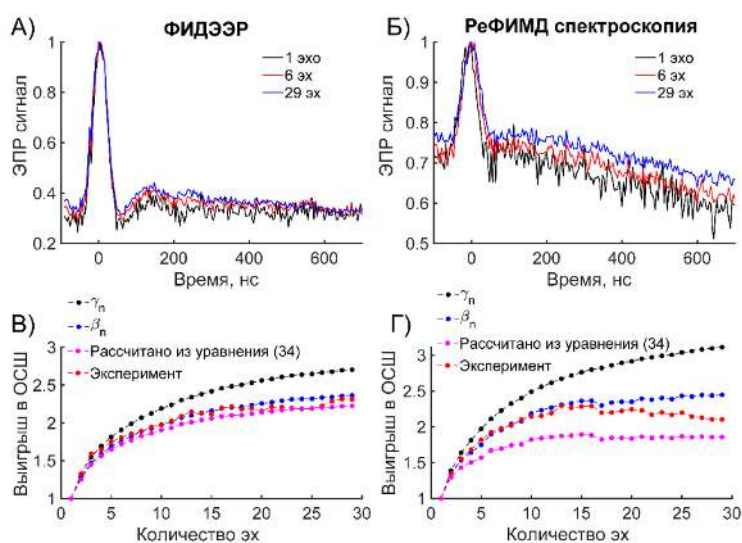


Рисунок 43. Эксперименты ФИДЭЭР и РеФИМД спектроскопии с применением блоков КПМГ_n ($n=1-29$) для C_{60}TAM в толуоле с концентрацией 24 мкМ. А, Б) Временные зависимости для различного числа интегрированных эх: $n=1$ (черная линия), 6 (красная линия) и 29 (синяя линия). В, Г) Соответствующие зависимости выигрыша ОСШ от n : ожидаемые значения γ_n , рассчитанные по уравнению (29) (черная линия); скорректированные значения β_n , учитывающие глубину модуляции согласно уравнению (30) (синяя линия); экспериментальный выигрыш ОСШ (красная линия); и выигрыш ОСШ, предсказанный по уравнению (34) (розовая линия).

Экспериментальный выигрыш ОСШ действительно приближается к ожидаемому β_n . В случае РеФИМД спектроскопии было получено даже большее улучшение, чем предсказывалось «из первых принципов»: скорее всего, меньшая концентрация фотоиндуцируемой метки также уменьшает шум из-за нагрева образца (в этом случае флуктуации мощности лазерных импульсов не влияют на флуктуации интенсивности сигнала TAM, а только на флуктуации амплитуды модуляции). В такой ситуации уравнение (33) необходимо модифицировать, чтобы учесть только абсолютное значение глубины модуляции для расчета $\sigma_{\text{лазер}}$, что уменьшает $\sigma_{\text{лазер}}$ примерно в 3 раза. Наконец, при использовании меньших концентраций фотоиндуцируемой метки лазерный

импульс возбуждает все метки в образце, поэтому флуктуации интенсивности мощности лазерных импульсов должны становиться менее критичными.

4.4 Заключение

В данной главе предложен и продемонстрирован подход к сокращению времени накопления сигнала в импульсных ЭПР-экспериментах с фотовозбужденными триплетными состояниями путем использования блоков динамической развязки со множественным рефокусированием эхо-сигналов (в частности, последовательностей типа КПМГ). Это усовершенствование позволило достичь прироста чувствительности за счет относительно простых методических и технических модификаций.

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.

Результаты, представленные в этой главе, показывают, что РНП и диполь-дипольное взаимодействие в спиновой паре вносят вклад в электронную спиновую декогеренцию при применении блоков динамической развязки. Показано, что применение блоков КПМГ не приводит к искажению распределений расстояний, получаемых в методах ФИДЭЭР и РеФИМД. Однако эффективность метода критически зависит от стабильности мощности лазерного импульса. Для систем с интенсивным ЭПР-сигналом даже 2%-ные флуктуации энергии лазерных импульсов существенно снижают чувствительность: в случае ФИДЭЭР эффективность заметно падает, а в РеФИМД практически полностью утрачивается. Напротив, в системах с более слабым сигналом влияние этих флуктуаций оказывается значительно меньшим.

В частности, для диады C_{60} ТАМ при концентрации около 20 мкМ уровень шума спектрометра становится доминирующим фактором, и флуктуации мощности лазера практически не влияют на результат. В этом случае достигается ~2.4-кратное увеличение чувствительности как в ФИДЭЭР, так и в РеФИМД, что позволяет сократить общее время накопления примерно в шесть раз.

Так как S_{60} 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 низкоконтрированных образцов 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.

ОСНОВНЫЕ 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 ТМРуР4 (мезо-тетра(N-метил-4-пиридил) порфирин).
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 ТМРуР4 локализуется на G-квадруплексе в нескольких позициях, включая ранее предсказанную позицию АРТ2 на нижней тетраде антипараллельной структуры. Фотооблучение комплекса HTel-22/ТМРуР4 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 гем-сайта, наряду с дополнительными сайтами на поверхности белка. Катионные порфирины локализуются исключительно на поверхности альбумина, занимая несколько различных участков.
5. Показано, что применение блоков динамической развязки 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 динамической развязки. 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДТТ – дитиотреитол

ДЭЭР – двойной электрон-электронный резонанс

ДЭЯР – двойной электрон-ядерный резонанс

ИКК – интеркомбинационная конверсия

КПМГ – последовательность Карра-Парселла-Мейбума-Гилл

Крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия

ОП – оптическая плотность

ОСШ – отношение сигнала к шуму

ОСО – относительное стандартное отклонение

РеФИМД спектроскопия – фотоиндуцированная магнитодипольная спектроскопия с рефокусированием

РНП – расщепление в нулевом поле

ТАМ – триарилметильный радикал

ФДТ – фотодинамическая терапия рака

ФИМД спектроскопия – фотоиндуцированная магнитодипольная спектроскопия

ФИДЭЭР – спектроскопия фотоиндуцированного двойного электрон-электронного резонанса

ФРПЭ – Ферстеровский резонансный перенос энергии

ФС - фотосенсибилизатор

ЧСА – человеческий сывороточный альбумин

ЭД спектр – эхо-детектируемый спектр

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ЭСЭ – электронное спиновое эхо

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Cys34 – цистеин 34

СЗРу – 5,10,15,20-тетракис(4-(4-пиридил-п-бутаноил)оксифенил)порфирин тетрабромид

С5Ру – 5,10,15,20-тетракис(4-(6-пиридил-п-гексаноил)оксифенил)порфирин тетрабромид

ДСРР – 5,15-ди(п-карбоксифенил)порфирин

HTel-22 – теломерная G-квадруплексная ДНК человека

ТСРР – мезо-тетра(4-карбоксифенил)порфирин

ТНРР – 5,10,15,20-тетракис(4-гидроксифенил)порфирин

ТМРyP4 – мезо-тетра(4-N-метилпиридил)порфирин

TSPP – мезо-тетра-(4-сульфонатофенил)порфирин

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор приносит искреннюю благодарность своему научному руководителю, доктору физико-математических наук Олеся Анатольевне Крумкачевой, за постоянную поддержку и неоценимую помощь как в ходе выполнения данного исследования, так и за ее пределами. Также выражается признательность всему коллективу лаборатории ЭПР-спектроскопии МТЦ СО РАН за творческую атмосферу и содействие в реализации научных задач. Особая благодарность младшему научному сотруднику М. И. Колоколову за предоставленные материалы по компьютерному моделированию.

Искренняя благодарность коллегам из РТУ МИРЭА к.х.н. Ждановой К. А., д.х.н. Брагиной Н. А. за плодотворное сотрудничество. Автор также благодарен к.х.н. Чубарову А. С. (ИХБФМ СО РАН) за помощь в обсуждении результатов и синтез спин-меченных производных ДНК.

И безграничная благодарность моему мужу Юрпалову А. С. за постоянную поддержку и создание приятной атмосферы для работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Siddiqui, S. Studying the interaction of drug/ligand with serum albumin / S. Siddiqui, F. Ameen, S. ur Rehman [et al.] // *Journal of Molecular Liquids*. – 2021. – Vol. 336. – P. 116200.
2. DiCarluccio, C. Investigation of protein-ligand complexes by ligand-based NMR methods / C. Di Carluccio, M. C. Forgione, S. Martini [et al.] // *Carbohydrate Research*. – 2021. – Vol. 503. – P. 108313.
3. Zhou, W. Cationic Porphyrin-Mediated G-Quadruplex DNA Oxidative Damage: Regulated by the Initial Interplay between DNA and TMPyP4 / W. Zhou, Y. Cheng, B. Song [et al.] // *Biochemistry*. – 2021. – Vol. 60, № 48. – P. 3707–3713.
4. 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.
5. Drescher, M. EPR in protein science: Intrinsically disordered proteins / M. Drescher // *Topics in Current Chemistry*. – 2012. – Vol. 321. – P. 91–120.
6. Hofmann, L. EPR Spectroscopy Provides New Insights into Complex Biological Reaction Mechanisms / L. Hofmann, S. Ruthstein // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2022. – Vol. 126, № 39. – P. 7486–7494.
7. Drescher, M. EPR Spectroscopy: Applications in Chemistry and Biology / M. Drescher, G. Jeschke // *EPR Spectroscopy* - Springer Science & Business Media, 2011. – P. 247
8. Hoff, A. J. Advanced EPR: Applications in Biology and Biochemistry / A. J. Hoff // *Advanced EPR*. – Elsevier, 2012. – P. 943
9. Jeschke, G. The contribution of modern EPR to structural biology / G. Jeschke // *Emerging Topics in Life Sciences*. – 2018. – Vol. 2, № 1. – P. 9–18.
10. Sannikova, N. E. Revealing light-induced structural shifts in G-quadruplex-porphyrin complexes: a pulsed dipolar EPR study / N. E. Sannikova, M. I. Kolokolov, T. A. Khlynova [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2023. – Vol. 25, № 33. – P. 22455–22466.
11. 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.
12. 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.
13. Paul, M. Current trends in the use of human serum albumin for drug delivery in cancer / M. Paul, A. M. Itoo, B. Ghosh, S. Biswas // *Expert Opinion on Drug Delivery*. – 2022. – Vol. 19, № 11. – P. 1449–1470.
14. Pham, T. C. Recent Strategies to Develop Innovative Photosensitizers for Enhanced Photodynamic Therapy / T. C. Pham, V.-N. Nguyen, Y. Choi, S. Lee, J. Yoon // *Chemical Reviews*. – 2021. – Vol. 121, № 21. – P. 13454–13619.

15. Tanzadehpanah, H. Binding site identification of anticancer drug gefitinib to HSA and DNA in the presence of five different probes / H. Tanzadehpanah, H. Mahaki, N. H. Moghadam [et al.] // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2019. – Vol. 37, № 4. – P. 823–836.
16. Fanali, G. Human serum albumin: From bench to bedside / G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza [et al.] // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2012. – Vol. 33, № 3. – P. 209–290.
17. Monsen, R. C. G-quadruplex DNA: a longer story / R. C. Monsen, J. O. Trent, J. B. Chaires // *Accounts of chemical research*. – 2022. – Vol. 55, № 22. – P. 3242–3252.
18. 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.
19. 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.
20. Haugland, M. M. Advances in the synthesis of nitroxide radicals for use in biomolecule spin labelling / M. M. Haugland, J. E. Lovett, E. A. Anderson // *Chemical Society Reviews*. – 2018. – Vol. 47, № 3. – P. 668–680.
21. Torricella, F. Nitroxide spin labels and EPR spectroscopy: A powerful association for protein dynamics studies / F. Torricella, A. Pierro, E. Mileo [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. – 2021. – Vol. 1869, № 7. – P. 140653.
22. J. P. Klare, H.-J. Steinhoff, Spin labeling EPR // *Photosynth. Res.* – 2009. – Vol. 102. – P. 377–390.
23. Lubitz, W. Radicals, Radical Pairs and Triplet States in Photosynthesis / W. Lubitz, F. Lendzian, R. Bittl // *Accounts of Chemical Research*. – 2002. – Vol. 35, № 5. – P. 313–320.
24. Bieber, A. Light-induced dipolar spectroscopy – A quantitative comparison between LiDEER and LaserIMD / A. Bieber, D. Bücke, M. Drescher // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2018. – Vol. 296. – P. 29–35.
25. Warren, G. L. Essential considerations for using protein–ligand structures in drug discovery / G. L. Warren, T. D. Do, B. P. Kelley [et al.] // *Drug Discovery Today*. – 2012. – Vol. 17, № 23–24. – P. 1270–1281.
26. Merino, F. Electron Cryo-microscopy as a Tool for Structure-Based Drug Development / F. Merino, S. Raunser // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2017. – Vol. 56, № 11. – P. 2846–2860.
27. Sutanto, F. Combining High-Throughput Synthesis and High-Throughput Protein Crystallography for Accelerated Hit Identification / F. Sutanto, S. Shaabani, R. Oerlemans [et al.] // *Angewandte Chemie*. – 2021. – Vol. 133, № 33. – P. 18379–18387.
28. Creutzmacher, R. NMR Experiments Provide Insights into Ligand-Binding to the SARS-CoV-2 Spike Protein Receptor-Binding Domain / R. Creutzmacher, T. Maass, B. Veselkova [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2022. – Vol. 144, № 29. – P. 13060–13065.
29. Renaud, J.-P. Cryo-EM in drug discovery: achievements, limitations and prospects / J.-P. Renaud, A. Chari, C. Ciferri [et al.] // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2018. – Vol. 17, № 7. – P. 471–492.

30. Takeuchi, K. Structure determination using solution NMR: Is it worth the effort? / K. Takeuchi, K. Baskaran, H. Arthanari // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2019. – Vol. 306. – P. 195–201.
31. Maveyraud, L. Protein X-ray Crystallography and Drug Discovery / L. Maveyraud, L. Mourey // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 5. – P. 1030.
32. Goldfarb, D. EPR spectroscopy: fundamentals and methods / D. Goldfarb, S. Stoll (ed.). – John Wiley & Sons, 2018.
33. Emmanouilidis, L. Structural biology of RNA-binding proteins in the context of phase separation: What NMR and EPR can bring? / L. Emmanouilidis, L. Esteban-Hofer, G. Jeschke [et al.] // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2021. – Vol. 70. – P. 132–138.
34. Endeward, B. Long-range distance determination in fully deuterated RNA with pulsed EPR spectroscopy / B. Endeward, Y. Hu, G. Bai [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2022. – Vol. 121, № 1. – P. 37–43.
35. Yang, Z. A triarylmethyl spin label for long-range distance measurement at physiological temperatures using T1 relaxation enhancement / Z. Yang, M. D. Bridges, C. J. López [et al.] // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2016. – Vol. 269. – P. 50–54.
36. Schiemann, O. Benchmark Test and Guidelines for DEER/PELDOR Experiments on Nitroxide-Labeled Biomolecules / O. Schiemann, C. A. Heubach, D. Abdullin [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2021. – Vol. 143, № 43. – P. 17875–17890.
37. Goldfarb, D. Exploring protein conformations in vitro and in cell with EPR distance measurements / D. Goldfarb // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2022. – Vol. 75, № 11. – P. 102398.
38. Wort, J. L. Sub-Micromolar Pulse Dipolar EPR Spectroscopy Reveals Increasing CuII-labelling of Double-Histidine Motifs with Lower Temperature / J. L. Wort, K. Ackermann, A. Giannoulis [et al.] // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2019. – Vol. 58. – P. 11681–11685.
39. Pierro, A. Probing the Structural Dynamics of a Bacterial Chaperone in Its Native Environment by Nitroxide-Based EPR Spectroscopy / A. Pierro, A. Bonucci, D. Normanno [et al.] // *Chemistry – A European Journal*. – 2022. – Vol. 28, № 66. – P. e202202249.
40. Igbaria-Jaber, Y. Revealing the DNA Binding Modes of CsoR by EPR Spectroscopy / Y. Igbaria-Jaber, L. Hofmann, L. Gevorgyan-Airapetov [et al.] // *ACS Omega*. – 2023. – Vol. 8, № 42. – P. 39886–39895.
41. Li, H. Emerging applications of site-directed spin labeling electron paramagnetic resonance (SDSL-EPR) to study food protein structure, dynamics, and interaction / H. Li, Y. Pan, Z. Yang [et al.] // *Trends in Food Science & Technology*. – 2021. – Vol. 109. – P. 37–50.
42. Klug, C. S. Methods and Applications of Site-Directed Spin Labeling EPR Spectroscopy / C. S. Klug, J. B. Feix // *Methods in Cell Biology : Biophysical Tools for Biologists, Volume One: In Vitro Techniques*. – Academic Press, 2008. – Vol. 84. – P. 617–658.
43. Sannikova, N. Electron spin relaxation of photoexcited porphyrin in water—glycerol glass / N. Sannikova, I. Timofeev, E. Bagryanskaya [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 11. – P. 2677.
44. Krumkacheva, O., E. Bagryanskaya, Trityl radicals as spin labels. – 2017.

45. Casto, J. PELDOR to the metal: Cu (II)-based labels put a new spin on distance measurements / J. Casto, P. Shramana, S. Saxena // *Applied Magnetic Resonance*. – 2024. – Vol. 55, № 9. – P. 889–922.
46. Giannoulis, A. Chapter Eight - Characteristics of Gd(III) spin labels for the study of protein conformations / A. Giannoulis, Y. Ben-Ishay, D. Goldfarb // *Academic Press*, 2021. – Vol. 651. – P. 235–290.
47. Berliner, L. J. A novel reversible thiol-specific spin label: Papain active site labeling and inhibition / L. J. Berliner, J. Grunwald, H. O. Hankovszky [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 1982. – Vol. 119, № 2. – P. 450–455.
48. Берлинер, Л. М., Метод спиновых меток. Теория и применение / Л. М. Берлинер. – Москва : Мир, 1979. – 639 с.
49. Axel, F. S. Biophysics with nitroxyl radicals / F. S. Axel // *Biophysics of structure and mechanism*. – 1976. – Vol. 2, № 3. – P. 181–218.
50. Jassoy, J. J. Versatile trityl spin labels for nanometer distance measurements on biomolecules in vitro and within cells / J. J. Jassoy, A. Berndhäuser, F. Duthie [et al.] // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2017. – Vol. 56, № 1. – P. 177–181.
51. Dhimitruka, I. Phosphonated Trityl Probes for Concurrent in Vivo Tissue Oxygen and pH Monitoring Using Electron Paramagnetic Resonance-Based Techniques / I. Dhimitruka, A. A. Bobko, T. D. Eubank [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2013. – Vol. 135, № 15. – P. 5904–5910.
52. Liu, W. Synthesis and Characterization of PEGylated Trityl Radicals: Effect of PEGylation on Physicochemical Properties / W. Liu, J. Nie, X. Tan [et al.] // *Journal of Organic Chemistry*. – 2017. – Vol. 82, № 1. – P. 588–596.
53. Keller, K. EPR characterization of Mn(II) complexes for distance determination with pulsed dipolar spectroscopy / K. Keller, M. Zalibera, M. Qi [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2016. – Vol. 18, № 36. – P. 25120–25135.
54. Martorana, A. Mn(II) tags for DEER distance measurements in proteins via C–S attachment/ A. Martorana, Y. Yang, Y. Zhao [et al.] // *Dalton Transactions*. – 2015. – Vol. 44. – P. 20812–20816.
55. Astashkin, A. V. Determination of the Distance between the Mo(V) and Fe(III) Heme Centers of Wild Type Human Sulfite Oxidase by Pulsed EPR Spectroscopy / A. V. Astashkin, A. Rajapakshe, M. J. Cornelison [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2012. – Vol. 116, № 6. – P. 1942–1950.
56. Abdullin, D. Pulsed Dipolar EPR Spectroscopy and Metal Ions: Methodology and Biological Applications / D. Abdullin, O. Schiemann // *ChemPlusChem*. – 2020. – Vol. 85, № 2. – P. 353–372.
57. Merz, G. E. Site-Specific Incorporation of a Cu²⁺ Spin Label into Proteins for Measuring Distances by Pulsed Dipolar Electron Spin Resonance Spectroscopy / G. E. Merz, P. P. Borbat, A. R. Muok [et al.] // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2018. – Vol. 122, № 41. – P. 9443–9451.
58. Ghosh, S. Cu²⁺-based distance measurements by pulsed EPR provide distance constraints for DNA backbone conformations in solution / S. Ghosh, M. J. Lawless, H. J. Brubaker [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2020. – Vol. 48, № 9. – P. e49.
59. Singewald, K. Measurement of Protein Dynamics from Site Directed Cu(II) Labeling / K. Singewald, H. Hunter, T. F. Cunningham [et al.] // *Analysis & Sensing*. – 2023. – Vol. 3, № 1. – P. e202200053.

60. Narr, E. Selective Measurements of a Nitroxide–Nitroxide Separation of 5 nm and a Nitroxide–Copper Separation of 2.5 nm in a Terpyridine-Based Copper(II) Complex by Pulse EPR Spectroscopy / E. Narr, A. Godt, G. Jeschke // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2002. – Vol. 41. – P. 3907–3910.
61. Goldfarb, D. Gd³⁺ spin labeling for distance measurements by pulse EPR spectroscopy / D. Goldfarb // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2014. – Vol. 16, № 21. – P. 9685–9699.
62. Goldfarb, D. HYSCORE and DEER with an upgraded 95 GHz pulse EPR spectrometer / D. Goldfarb, Y. Lipkin, A. Potapov [et al.] // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2008. – Vol. 194, № 1. – P. 8–15.
63. Hintze, C. Laser-Induced Magnetic Dipole Spectroscopy / C. Hintze, D. Bückner, S. Domingo Köhler [et al.] // *Journal of Physical Chemistry Letters*. – 2016. – Vol. 7, № 12. – P. 2204–2209.
64. Dal Farra, M. G. Light-Induced Pulsed EPR Dipolar Spectroscopy on a Paradigmatic Hemeprotein / M. G. Dal Farra, S. Richert, C. Martin [et al.] // *ChemPhysChem*. – 2019. – Vol. 20, № 7. – P. 931–935.
65. Carbonera, D. Light-Induced Porphyrin-Based Spectroscopic Ruler for Nanometer Distance Measurements / D. Carbonera, M. G. Dal Farra, M. Albertini [et al.] // *Chemistry - A European Journal*. – 2016. – Vol. 22, № 48. – P. 17204–17214.
66. Serrer, K. Application of commercially available fluorophores as triplet spin probes in EPR spectroscopy / K. Serrer, C. Matt, M. Sokolov [et al.] // *Molecular Physics*. – 2019. – Vol. 117, № 19. – P. 2688–2699.
67. Williams, L. Site-directed attachment of photoexcitable spin labels for light-induced pulsed dipolar spectroscopy / L. Williams, S. Tischlik, A. Scherer [et al.] // *Chemical Communications*. – 2020. – Vol. 56, № 93. – P. 14669–14672.
68. Dąbrowski, J. M. Reactive oxygen species in photodynamic therapy: mechanisms of their generation and potentiation / J. M. Dąbrowski // *Advances in inorganic chemistry*. – 2017. – Vol. 70. – P. 343–394.
69. Sasikumar, D. Access to the triplet excited states of organic chromophores / D. Sasikumar, A. T. John, J. Sunny [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2020. – Vol. 49, № 17. – P. 6122–6140.
70. Atkins, P. W. Electron spin polarization in a rotating triplet / P. W. Atkins, G. T. Evans // *Molecular Physics*. – 1974. – Vol. 27, № 6. – P. 1633–1644.
71. Pedersen, J. B. Theory of chemically induced dynamic electron polarization. III. Initial triplet polarizations / J. B. Pedersen, J. H. Freed // *The Journal of Chemical Physics*. – 1975. – Vol. 62, № 5. – P. 1706–1711.
72. Bertran, A. Light-induced pulsed dipolar EPR spectroscopy for distance and orientation analysis / A. Bertran, A. Barbon, A. M. Bowen [et al.] // *Methods in Enzymology*. – 2022. – Elsevier. – Vol. 666. – P. 171–231.
73. Kandrashkin, Y. E. The triplet mechanism of electron spin polarization in moderately coupled triplet-doublet rigid complexes as a source of the enhanced $+1/2 \rightarrow -1/2$ transitions / Y. E. Kandrashkin, A. Van Der Est // *Journal of Chemical Physics*. – 2019. – Vol. 151, № 18. – P. 184301.
74. Kandrashkin, Y. E. Enhanced intersystem crossing due to resonant energy transfer to a remote spin / Y. E. Kandrashkin, A. van der Est // *The Journal of Physical Chemistry Letters*. – 2021. – Vol. 12, № 30. – P. 7312–7318.

75. Poddutoori, P. K. Spin–Spin Interactions in Porphyrin-Based Monoverdazyl Radical Hybrid Spin Systems / P. K. Poddutoori [et al.] // *Inorganic chemistry*. – 2010. – Vol. 49, № 7. – P. 3516–3524.
76. Dyar, S. M. Photogenerated quartet state formation in a compact ring-fused perylene-nitroxide / S. M. Dyar [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2015. – Vol. 119, № 43. – P. 13560–13569.
77. Mayländer, M. Distance dependence of enhanced intersystem crossing in BODIPY–nitroxide dyads / M. Mayländer, T. Quintes, M. Franz [et al.] // *Chemical Science*. – 2023. – Vol. 14, № 20. – P. 5361–5368.
78. Poole, C. P., Jr. Standardization of convention for zero field splitting parameters / C. P. Poole, Jr., H. A. Farach, W. K. Jackson // *The Journal of Chemical Physics*. – 2003. – Vol. 61, № 6. – P. 2220–2221.
79. Sannikova, N. E. Study of Cationic Porphyrins and Their Metal Complexes by ESR Techniques / N. E. Sannikova, K. A. Zhdanova, A. S. Spitsyna [et al.] // *Russian Journal of Coordination Chemistry*. – 2022. – Vol. 48, № 1. – P. 1–8.
80. Yamauchi, A. Design Guidelines to Elongate Spin–Lattice Relaxation Times of Porphyrins with Large Triplet Electron Polarization / A. Yamauchi, S. Fujiwara, K. Nishimura [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2021. – P. 4334–4340.
81. Strzelczyk, R. Analysis and Simulation of EPR Spectra of Photoexcited Triplet States / R. Strzelczyk, S. Ciuti, A. Carella [et al.] // *Applied Magnetic Resonance*. – 2024. – Vol. 55, № 12. – P. 1515–1537.
82. Kottis, P. Calculation of the Electron Spin Resonance Line Shape of Randomly Oriented molecules in a Triplet State. II. Correlation of the Spectrum with the Zero-Field Splitting. Introduction of an Orientation-Dependent Linewidth / P. Kottis, R. Lefebvre // *The Journal of Chemical Physics*. – 1964. – Vol. 41, № 2. – P. 379–393.
83. Shames, A. I. Native and induced triplet nitrogen-vacancy centers in nano- and micro-diamonds: Half-field electron paramagnetic resonance fingerprint / A. I. Shames, V. Yu. Osipov, H.-J. Von Bardeleben [et al.] // *Applied Physics Letters*. – 2014. – Vol. 104, № 6. – P. 063107.
84. Itoh, K. Determination of the singlet-triplet separation of a weakly interacting radical pair from the E.S.R. spectrum / K. Itoh, H. Hayashi, S. Nagakura // *Molecular Physics*. – 1969. – Vol. 17, № 6. – P. 561–577.
85. Redman, A. J. EPR of Photoexcited Triplet-State Acceptor Porphyrins / A. J. Redman, G. Moise, S. Richert [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2021. – T. 125, № 21. – P. 11782–11790.
86. Richert, S. Delocalisation of photoexcited triplet states probed by transient EPR and hyperfine spectroscopy / S. Richert, C. E. Tait, C. R. Timmel // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2017. – Vol. 280. – P. 103–116.
87. Riplinger, C. Interaction of Radical Pairs Through-Bond and Through-Space: Scope and Limitations of the Point-Dipole Approximation in Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy / C. Riplinger, J. P. Y. Kao, G. M. Rosen [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2009. – Vol. 131, № 29. – P. 10092–10106.
88. Tait, C. E. Transient EPR reveals triplet state delocalization in a series of cyclic and linear π -conjugated porphyrin oligomers / C. E. Tait, P. Neuhaus, M. D. Peeks, H. L. Anderson, C. R. Timmel // *Journal of the American Chemical Society*. – 2015. – Vol. 137, № 25. – P. 8284–8293.

89. Borbat, P. P. Improved sensitivity for long-distance measurements in biomolecules: Five-pulse double electron-electron resonance / P. P. Borbat, E. R. Georgieva, J. H. Freed // *Journal of Physical Chemistry Letters*. – 2013. – Vol. 4, № 1. – P. 170–175.
90. Милов, А. Д. Применение Метода Двойного Резонанса В Электронном Спиновом Эхо Для Изучения Пространственного Распределения Парамагнитных Центров В Твердых Телах / А. Д. Милов, К. М. Салихов, М. Д. Щиров // *Физика Твердого Тела*. – 1981. – Т. 23, № 4. – С. 975–982.
91. Sameach, H. EPR Spectroscopy Detects Various Active State Conformations of the Transcriptional Regulator CueR / H. Sameach, S. Ghosh, L. Gevorkyan-Airapetov [et al.] // *Angewandte Chemie*. – 2019. – Vol. 131, № 10. – P. 3085–3088.
92. Mchaourab, H. S. Determination of protein folds and conformational dynamics using spin-labeling EPR spectroscopy / H. S. Mchaourab, E. Perozo // *Distance measurements in biological systems by EPR*. – 2000. – P. 185–247.
93. Stewart, A. M. Combined Pulsed Electron Double Resonance EPR and Molecular Dynamics Investigations of Calmodulin Suggest Effects of Crowding Agents on Protein Structures / A. M. Stewart, M. Shanmugam, R. J. Kutta [et al.] // *Biochemistry*. – 2022. – Vol. 61, № 17. – P. 1735–1742.
94. Kazemi, S. Efficient determination of the accessible conformation space of multi-domain complexes based on EPR PELDOR data / S. Kazemi, A. Lopata, A. Kniss [et al.] // *Journal of Biomolecular NMR*. – 2023. – Vol. 77, № 5-6. – P. 261–269.
95. Gränz, M. Dynamics of Nucleic Acids at Room Temperature Revealed by Pulsed EPR Spectroscopy / M. Gränz, N. Erlenbach, P. Spindler [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2018. – Vol. 57, № 33. – P. 10540–10543.
96. Yang, Z. Pulsed ESR dipolar spectroscopy for distance measurements in immobilized spin labeled proteins in liquid solution / Z. Yang, Y. Liu, P. Borbat [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – Vol. 134, № 24. – P. 9950–9952.
97. Kuzhelev, A. A. Saccharides as Prospective Immobilizers of Nucleic Acids for Room-Temperature Structural EPR Studies / A. A. Kuzhelev, G. Y. Shevelev, O. A. Krumkacheva [et al.] // *Journal of Physical Chemistry Letters*. – 2016. – Vol. 7, № 13. – P. 2544–2548.
98. Abragam, A., *The Principles of Nuclear Magnetism* // Oxford university press – 1961. – Vol. 32.
99. Maryasov, A. G., M. K. Bowman, Anisotropic g-Tensor and Abragam's Dipole Alphabet: New Words // *Applied Magnetic Resonance*. – 2023. – Vol. 54. – P. 29-45.
100. Pannier, M. Dead-Time Free Measurement of Dipole-Dipole Interactions between Electron Spins / M. Pannier, S. Veit, A. Godt [et al.] // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2000. – Vol. 142, № 2. – P. 331–340.
101. Jeschke, G. DEER distance measurements on proteins / G. Jeschke // *Annual Review of Physical Chemistry*. – 2012. – Vol. 63. – P. 419–446.
102. Abdullin, D. EPR-Based Approach for the Localization of Paramagnetic Metal Ions in Biomolecules / D. Abdullin, N. Florin, G. Hagelueken [et al.] // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2015. – Vol. 127. – P. 1847–1851.

103. Alonso-García, N. Combination of X-ray crystallography, SAXS and DEER to obtain the structure of the FnIII-3,4 domains of integrin $\alpha 6\beta 4$ / N. Alonso-García, I. García-Rubio, J. A. Manso [et al.] // *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. – 2015. – Vol. 71, № 4. – P. 969–985.
104. Sahu, I. D. DEER EPR Measurements for Membrane Protein Structures via Bi-functional Spin Labels and Lipoid's Nanoparticles / I. D. Sahu, R. M. McCarrick, K. R. Troxel [et al.] // *Biochemistry*. – 2013. – Vol. 52, № 38. – P. 6627–6632.
105. Banham, J.E. Distance measurements in the borderline region of applicability of CW EPR and DEER: A model study on a homologous series of spin-labelled peptides / J.E. Banham, C. M. Baker, S. Ceola [et al.] // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2008. – Vol. 191, № 2. – P. 202–218.
106. Yang, Z. Long-Range Distance Measurements in Proteins at Physiological Temperatures Using Saturation Recovery EPR Spectroscopy / Z. Yang, G. Jiménez-Osés, C. J. López [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2014. – Vol. 136, № 43. – P. 15356–15365.
107. Krstić, I. Long-Range Distance Measurements on Nucleic Acids in Cells by Pulsed EPR Spectroscopy / I. Krstić, R. Hänsel, O. Romainczyk [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2011. – Vol. 50, № 22. – P. 5070–5074.
108. Tsvetkov, Y. D. Pulsed electron–electron double resonance (PELDOR) as EPR spectroscopy in nanometre range / Y. D. Tsvetkov, A. D. Milov, A. G. Maryasov // *Russian Chemical Reviews*. – 2008. – Vol. 77, № 6. – P. 487.
109. Chiang, Y.-W. The determination of pair distance distributions by pulsed ESR using Tikhonov regularization / Y.-W. Chiang, P. P. Borbat, J. H. Freed // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2005. – Vol. 172, № 2. – P. 279–295.
110. Worswick, S. G. Deep neural network processing of DEER data / S. G. Worswick, J. A. Spencer, G. Jeschke [et al.] // *Science Advances*. – 2018. – Vol. 4, № 8. – P. eaat5218
111. Giannoulis, A. Orientation selection in high-field RIDME and PELDOR experiments involving low-spin CoII ions / A. Giannoulis, C. L. Motion, M. Oranges [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2018. – Vol. 20, № 4. – P. 2151–2154.
112. Bode, B. E. PELDOR measurements on a nitroxide-labeled Cu(II) porphyrin: Orientations selection, spin-density distribution, and conformational flexibility / B. E. Bode, J. Plackmeyer, T. F. Prisner [et al.] // *J. Phys. Chem. A*. – 2008. – Vol. 112. – P. 5064–5073.
113. Bowen, A. M. Exploiting orientation-selective DEER: determining molecular structure in systems containing Cu(II) centers / A. M. Bowen, M. W. Jones, J. E. Lovett [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2016. – Vol. 18, № 8. – P. 5981–5994.
114. Doll, A. Adiabatic and fast passage ultra-wideband inversion in pulsed EPR / A. Doll, S. Pribitzer, R. Tschaggelar [et al.] // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2013. – Vol. 230. – P. 27–39.
115. Scherer, A. The effect of the zero-field splitting in light-induced pulsed dipolar electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy / A. Scherer, B. Yildirim, M. Drescher // *Magnetic Resonance*. – 2023. – Vol. 4, № 1. – P. 27–46.
116. Maryasov, A. G. Dipole-dipole interactions of high-spin paramagnetic centers in disordered systems / A. G. Maryasov, M. K. Bowman, Yu. D. Tsvetkov // *Applied Magnetic Resonance*. – 2006. – Vol. 30, № 3-4. – P. 683–702.

117. Schweiger, A. Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance / A. Schweiger, G. Jeschke. – Oxford University Press, 2001. – P. 608
118. Salikhov, K. M. Three-Pulse ELDOR Theory Revisited / K. M. Salikhov, I. T. Khairuzhdinov, R. B. Zaripov // Applied Magnetic Resonance. – 2014. – Vol. 45, № 6. – P. 573–619.
119. Bowman, M. K. Dynamic phase shifts in nanoscale distance measurements by double electron resonance (DEER) / M. K. Bowman, A. G. Maryasov // Journal of Magnetic Resonance. – 2007. – Vol. 185, № 2. – P. 270–282.
120. DalFarra, M. G. Triplet-state spin labels for highly sensitive pulsed dipolar spectroscopy / M. G. Dal Farra, S. Ciuti, M. Gobbo [et al.] // Molecular Physics. – 2019. – Vol. 117, № 19. – P. 2673–2687.
121. Bowen, A. M. Orientation-Selective and Frequency-Correlated Light-Induced Pulsed Dipolar Spectroscopy / A. M. Bowen, A. Bertran, K. B. Henbest [et al.] // The Journal of Physical Chemistry Letters. – 2021. – Vol. 12, № 15. – P. 3819–3826.
122. Timofeev, I. O. Fullerene-based triplet spin labels: methodology aspects for pulsed dipolar EPR spectroscopy / I. O. Timofeev, L. V. Politsanskaya, E. V. Tretyakov [et al.] // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2022. – Vol. 24, № 7. – P. 4475–4484.
123. Viola, L. Dynamical decoupling of open quantum systems / L. Viola, E. Knill, S. Lloyd // Physical Review Letters. – 1999. – Vol. 82, № 12. – P. 2417–2421.
124. Biercuk, M. J. Optimized dynamical decoupling in a model quantum memory / M. J. Biercuk, H. Uys, A. P. VanDevender [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 458, № 7241. – P. 996–1000.
125. Du, J. Preserving electron spin coherence in solids by optimal dynamical decoupling / J. Du, X. Rong, N. Zhao [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 461, № 7268. – P. 1265–1268.
126. Ajoy, A. Optimal pulse spacing for dynamical decoupling in the presence of a purely dephasing spin bath / A. Ajoy, G. A. Alvarez, D. Suter // Physical Review A. – 2011. – Vol. 83, № 3. – P. 032303.
127. Carr, H. Y. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments / H. Y. Carr, E. M. Purcell // Physical Review. – 1954. – Vol. 94, № 3. – P. 630–638.
128. Meiboom, S. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times / S. Meiboom, D. Gill // Review of Scientific Instruments. – 1958. – Vol. 29, № 8. – P. 688–691.
129. Siegel, R. Signal-to-noise enhancement of NMR spectra of solids using multiple-pulse spin-echo experiments / R. Siegel, T. T. Nakashima, R. E. Wasylshen // Concepts in Magnetic Resonance Part A. – 2005. – Vol. 26A, № 2. – P. 62–77.
130. Lim, B. J. Targetable Tetrazine-Based Dynamic Nuclear Polarization Agents for Biological Systems / B. J. Lim, B. E. Ackermann, G. T. Debelouchina // ChemBioChem. – 2020. – Vol. 21, № 9. – P. 1315–1319.
131. Eliav, U. Multipulse sequences in electron-spin echoes / U. Eliav, J. H. Freed // Review of Scientific Instruments. – 1983. – Vol. 54, № 10. – P. 1416–1417.
132. Mentink-Vigier, F. Increasing sensitivity of pulse EPR experiments using echo train detection schemes / F. Mentink-Vigier, A. Collauto, A. Feintuch [et al.] // Journal of Magnetic Resonance. – 2013. – Vol. 236. – P. 117–125.

133. Breitgoff, F. D. Artefact suppression in 5-pulse double electron resonance for distance distribution measurements / F. D. Breitgoff, J. Soetbeer, A. Doll [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2017. – Vol. 19, № 24. – P.15766–15779.
134. Spindler, P. E. Carr-Purcell Pulsed Electron Double Resonance with Shaped Inversion Pulses / P. E. Spindler, I. Waclawska, B. Endeward [et al.] // *Journal of Physical Chemistry Letters*. – 2015. – Vol. 6, № 21. – P. 4331–4335.
135. Soetbeer, J. Dynamical decoupling in water-glycerol glasses: a comparison of nitroxides, trityl radicals and gadolinium complexes / J. Soetbeer, M. Millen, K. Zouboulis [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2021. – Vol. 23, № 9. – P.5352–5369.
136. Soetbeer, J. Dynamical decoupling of nitroxides in o-terphenyl: a study of temperature, deuteration and concentration effects / J. Soetbeer, M. Hülsmann, A. Godt [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2018. – Vol. 20, № 3. – P.1615–1628.
137. Jeschke, G. Nuclear pair electron spin echo envelope modulation / G. Jeschke // *Journal of Magnetic Resonance Open*. – 2023. – Vols. 14-15. – P. 100094.
138. Kolarikova, M. Photodynamic therapy: Innovative approaches for antibacterial and anticancer treatments / M. Kolarikova, B. Hosikova, H. Dilenko [et al.] // *Medicinal Research Reviews*. – 2023. – Vol. 43, № 4. – P. 717–774.
139. Li, X. Activatable Photosensitizers: Agents for Selective Photodynamic Therapy / X. Li, S. Kolemen, J. Yoon [et al.] // *Advanced Functional Materials*. – 2017. – V.27, № 5. – P. 1604053.
140. Kwiatkowski, S. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations / S. Kwiatkowski, B. Knap, D. Przystupski [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2018. – Vol. 106. – P. 1098–1107.
141. Kato, H. Analysis of the Cost-effectiveness of Photodynamic Therapy in Early Stage Lung Cancer / H. Kato, T. Okunaka, T. Tsuchida [et al.] // *Diagnostic and Therapeutic Endoscopy*. – 1999. – Vol. 6, № 1. – P. 434579.
142. Wu, H. Role of photodynamic therapy in the treatment of esophageal cancer / H. Wu, T. Minamide, T. Yano // *Digestive Endoscopy*. – 2019. – Vol. 31, № 5. – P.508–516.
143. Wang, K. An update in clinical utilization of photodynamic therapy for lung cancer / K. Wang, B. Yu, J. L. Pathak // *Journal of Cancer*. – 2021. – Vol. 12, № 4. – P.1154–1160.
144. Osuchowski, M. Photodynamic therapy for prostate cancer – A narrative review / M. Osuchowski, D. Bartusik-Aebisher, F. Osuchowski [et al.] // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2021. – Vol. 33. – P. 102158.
145. Matoba, Y. Clinical application of photodynamic diagnosis and photodynamic therapy for gynecologic malignant diseases: A review / Y. Matoba, K. Banno, I. Kisu [et al.] // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2018. – Vol. 24. – P. 52–57.
146. Allison, R. R. Clinical photodynamic therapy of head and neck cancers—A review of applications and outcomes / R. R. Allison, R. E. Cuenca, G. H. Downie [et al.] // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2005. – Vol. 2, № 3. – P. 205–222.

147. Grin, M. Advantages of combined photodynamic therapy in the treatment of oncological diseases / M. Grin, N. Suvorov, P. Ostroverkhov [et al.] // *Biophysical Reviews*. – 2022. – Vol. 14, № 4. – P. 941–963.
148. Maharjan, P. S. Singlet Oxygen, Photodynamic Therapy, and Mechanisms of Cancer Cell Death / P. S. Maharjan, H. K. Bhattarai // *Journal of Oncology*. – 2022. – Vol. 2022, № 1. – P. 7211485.
149. Baptista, M. S. Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways / M. S. Baptista, J. Cadet, P. Di Mascio [et al.] // *Photochemistry and Photobiology*. – 2017. – Vol. 93, № 4. – P. 912–919.
150. Zhao, L. MTH1 inhibitor amplifies the lethality of reactive oxygen species to tumor in photodynamic therapy / L. Zhao, J. Li, Y. Su [et al.] // *Science Advances*. – 2020. – Vol. 6, № 10. – P. eaaz0575.
151. Chilakamarthi, U. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future / U. Chilakamarthi, L. Giribabu // *The Chemical Record*. – 2017. – Vol. 17, № 8. – P. 775–802.
152. Garcia-Diaz, M. Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy / M. Garcia-Diaz, Y.-Y. Huang, M. R. Hamblin // *Methods (San Diego, Calif.)*. – 2016. – Vol. 109. – P. 158–166.
153. Huang, Y.-Y. Stable Synthetic Bacteriochlorins for Photodynamic Therapy: Role of Dicyano Peripheral Groups, Central Metal Substitution (2H, Zn, Pd), and Cremophor EL Delivery / Y.-Y. Huang, T. Balasubramanian, E. Yang [et al.] // *ChemMedChem*. – 2012. – Vol. 7, № 12. – P. 2155–2167.
154. Yao, Q. The concept and examples of type-III photosensitizers for cancer photodynamic therapy / Q. Yao, J. Fan, S. Long [et al.] // *Chem*. – 2022. – Vol. 8, № 1. – P. 197–209.
155. Hirakawa, K. Guanine-specific DNA oxidation photosensitized by the tetraphenylporphyrin P(V) complex / K. Hirakawa, S. Kawanishi, H. Segawa [et al.] // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. – 2006. – Vol. 10, № 11. – P. 1285–1292.
156. Oleinick, L. N. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how / L. N. Oleinick, R. L. Morris, I. Belichenko // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2002. – Vol. 1, № 1. – P. 1–21.
157. Peng, Q. Correlation of Subcellular and Intratumoral Photosensitizer Localization with Ultrastructural Features After Photodynamic Therapy / Q. Peng, J. Moan, J. M. Nesland // *Ultrastructural Pathology*. – 1996. – Vol. 20, № 2. – P. 109–129.
158. Oliveira, C. S. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency / C. S. Oliveira, R. Turchiello, A. J. Kowaltowski [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2011. – Vol. 51, № 4. – P. 824–833.
159. Mroz, P. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer / P. Mroz, A. Yaroslavsky, G. B. Kharkwal [et al.] // *Cancers*. – 2011. – Vol. 3, № 2. – P. 2516–2539.
160. Moan, J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues / J. Moan // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 1990. – Vol. 6, № 3. – P. 343–344.
161. Ding, L. Cancer Cell-Targeted Photosensitizer and Therapeutic Protein Co-Delivery Nanoplatfrom Based on a Metal-Organic Framework for Enhanced Synergistic Photodynamic and

Protein Therapy / L. Ding, X. Lin, Z. Lin [et al.] // ACS Applied Materials and Interfaces. – 2020. – Vol. 12, № 33. – P. 36906–36916.

162. Mariño-Ocampo, N. Recent Photosensitizer Developments, Delivery Strategies and Combination-based Approaches for Photodynamic Therapy† / N. Mariño-Ocampo, L. Dibona-Villanueva, E. Escobar-Álvarez [et al.] // Photochemistry and Photobiology. – 2023. – Vol. 99, № 2. – P. 469–497.

163. Shieh, Y.-A. Aptamer-Based Tumor-Targeted Drug Delivery for Photodynamic Therapy / Y.-A. Shieh, S.-J. Yang, M.-F. Wei [et al.] // ACS Nano. – 2010. – Vol. 4, № 3. – P. 1433–1442.

164. Ambrus, A. Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution / A. Ambrus, D. Chen, J. Dai [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2006. – Vol. 34, № 9. – P. 2723–2735.

165. Bharti, S. K. DNA Sequences Proximal to Human Mitochondrial DNA Deletion Breakpoints Prevalent in Human Disease Form G-quadruplexes, a Class of DNA Structures inefficiently Unwound by the Mitochondrial Replicative Twinkle Helicase * / S. K. Bharti, J. A. Sommers, J. Zhou [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2014. – Vol. 289, № 43. – P. 29975–29993.

166. Asamitsu, S. Ligand Design to Acquire Specificity to Intended G-Quadruplex Structures / S. Asamitsu, T. Bando, H. Sugiyama // Chemistry – A European Journal. – 2019. – Vol. 25, № 2. – P. 417–430.

167. Cuesta, J. The Design of G-quadruplex Ligands as Telomerase Inhibitors / J. Cuesta, M. A. Read, S. Neidle // Mini Reviews in Medicinal Chemistry. – 2003. – Vol. 3, № 1. – P. 11–21.

168. O'Hagan, M. P. Binding and Beyond: What Else Can G-Quadruplex Ligands Do? / M. P. O'Hagan, J. C. Morales, M. C. Galan // European Journal of Organic Chemistry. – 2019. – Vol. 2019, № 31–32. – P. 4995–5017.

169. Lipps, H. J. G-quadruplex structures: in vivo evidence and function / H. J. Lipps, D. Rhodes // Trends in Cell Biology. – 2009. – Vol. 19, № 8. – P. 414–422.

170. Sundquist, W. I. Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops / W. I. Sundquist, A. Klug // Nature. – 1989. – Vol. 342, № 6251. – P. 825–829.

171. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: The Next Generation / D. Hanahan, R. A. Weinberg // Cell. – 2011. – Vol. 144, № 5. – P. 646–674.

172. Shay, J. W. A survey of telomerase activity in human cancer / J. W. Shay, S. Bacchetti // European Journal of Cancer. – 1997. – Vol. 33, № 5. – P. 787–791.

173. Sun, D. Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound / D. Sun, B. Hompson, B. E. Cathers [et al.] // Journal of medicinal chemistry. – 1997. – Vol. 40, № 14. – P. 2113–2116.

174. Cheng, M. G-Quadruplex/Porphyrin Composite Photosensitizer: A Facile Way to Promote Absorption Redshift and Photodynamic Therapy Efficacy / M. Cheng, Y.-X. Cui, J. Wang [et al.] // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2019. – Vol. 11, № 14. – P. 13158–13167.

175. Dai, J. Polymorphism of human telomeric quadruplex structures / J. Dai, M. Carver, D. Yang // Biochimie. – 2008. – Vol. 90, № 8. – P. 1172–1183.

176. Grün, J. T. Folding dynamics of polymorphic G-quadruplex structures / J. T. Grün, H. Schwalbe // *Biopolymers*. – 2022. – Vol. 113, № 1. – P. e23477.
177. Libera, V. Porphyrin Binding and Irradiation Promote G-Quadruplex DNA Dimeric Structure / V. Libera, E. A. Andreeva, A. Martel [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry Letters*. – 2021. – Vol. 12, № 33. – P. 8096–8102
178. Zeeshan, F. Human Serum Albumin as Multifunctional Nanocarrier for Cancer Therapy / F. Zeeshan, T. Madheswaran, J. Panneerselvam [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2021. – Vol. 110, № 9. – P. 3111–3117.
179. Tao, H. The development of human serum albumin-based drugs and relevant fusion proteins for cancer therapy / H. Tao, R. Wang, W. Sheng [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 187. – P. 24–34.
180. Dockal, M. Conformational Transitions of the Three Recombinant Domains of Human Serum Albumin Depending on pH / M. Dockal, D. C. Carter, F. Rüker // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275, № 5. – P. 3042–3050.
181. Farajzadeh-Dehkordi, N. Insights into the binding interaction of Reactive Yellow 145 with human serum albumin from a biophysics point of view / N. Farajzadeh-Dehkordi, S. Farhadian, Z. Zahraei [et al.] // *Journal of Molecular Liquids*. – 2023. – Vol. 369. – P. 120800.
182. Linciano, S. Molecular analysis and therapeutic applications of human serum albumin-fatty acid interactions / S. Linciano, G. Moro, A. Zorzi [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2022. – Vol. 348. – P. 115–126.
183. Singla, N. Efficient detection of bilirubin in human serum through a displacement approach / N. Singla, M. Ahmad, V. Mahajan [et al.] // *Sensors & Diagnostics*. – 2023. – Vol. 2, № 6. – P. 1574–1584.
184. Bertozzo, L. de C. Binding of fluorescent dansyl amino acids in albumin: When access to the protein cavity is more important than the strength of binding / L. de C. Bertozzo, M. Maszota-Zieleniak, M. Bolean [et al.] // *Dyes and Pigments*. – 2021. – Vol. 188. – P. 109195.
185. Alam, M. Multispectroscopic and molecular modeling strategy to explore the interaction of cholest-5-en-7-one with human serum albumin: DFT and Hirshfeld surface analysis / M. Alam // *Journal of King Saud University - Science*. – 2021. – Vol. 33, № 8. – P. 101661.
186. Sudlow, G. The use of spectroscopic techniques to study the binding of drugs to human serum albumin and to characterize interactions between drugs at protein binding sites / G. Sudlow. – UNSW Sydney, 1975.
187. Petitpas, I. Crystal Structure Analysis of Warfarin Binding to Human Serum Albumin / I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, S. Twine [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276, № 25. – P. 22804–22809.
188. Curry, S. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies / S. Curry, P. Brick, N. P. Franks // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 1999. – Vol. 1441, № 2. – P. 131–140.
189. Bal, W. Multi-metal binding site of serum albumin / W. Bal, J. Christodoulou, P. J. Sadler [et al.] // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 1998. – Vol. 70, № 1. – P. 33–39.

190. Obeng, E. M. FRET spectroscopy—towards effective biomolecular probing / E. M. Obeng, E. C. Dullah, M. K. Danquah [et al.] // *Analytical Methods*. – 2016. – Vol. 8, № 27. – P. 5323–5337.
191. Chowdhury, R. FRET between a donor and an acceptor covalently bound to human serum albumin in native and non-native states / R. Chowdhury, S. Chattoraj, S. S. Mojumdar [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2013. – Vol. 15, № 38. – P. 16286.
192. Sapsford, K. E. Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor–Acceptor Combinations / K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2006. – Vol. 45, № 28. – P. 4562–4589.
193. Santini, S. Revisitation of FRET methods to measure intraprotein distances in Human Serum Albumin / S. Santini, A. R. Bizzarri, S. Cannistraro // *Journal of Luminescence*. – 2016. – Vol. 179. – P. 322–327.
194. 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.
195. Sellers, E. M. Kinetics and Clinical Importance of Displacement of Warfarin from Albumin by Acidic Drugs* / E. M. Sellers, J. Koch-Weser // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1971. – Vol. 179, № 1. – P. 213–225.
196. Andrade, S. M. Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin fluorescence as reporter of human serum albumin structural changes induced by guanidine hydrochloride / S. M. Andrade, S. M. B. Costa // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2011. – Vol. 217, № 1. – P. 125–135.
197. Rozinek, S. C. Biophysical characterization of the interaction of human albumin with an anionic porphyrin / S. C. Rozinek, R. J. Thomas, L. Brancalion // *Biochemistry and Biophysics Reports*. – 2016. – Vol. 7. – P. 295–302.
198. Hasan, T. Photodynamic therapy of cancer / T. Hasan, B. Ortel, A. C. E. Moor [et al.] // *Cancer Medicine*. – 2003. – P. 605–622.
199. Zijlstra, W. G. Spectrophotometry of Hemoglobin: Absorption Spectra of Bovine Oxyhemoglobin, Deoxyhemoglobin, Carboxyhemoglobin, and Methemoglobin / W. G. Zijlstra, A. Buursma // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 1997. – Vol. 118, № 4. – P. 743–749.
200. Ethirajan, M. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy / M. Ethirajan, Y. Chen, P. Joshi [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2011. – Vol. 40, № 1. – P. 340–362.
201. Kou, J. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications / J. Kou, D. Dou, L. Yang // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 46. – P. 81591–81603.
202. Zheng, W. UV–visible, fluorescence and EPR properties of porphyrins and metalloporphyrins / W. Zheng, N. Shan, L. Yu [et al.] // *Dyes and Pigments*. – 2008. – Vol. 77, № 1. – P. 153–157.
203. Lang, K. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy / K. Lang, J. Mosinger, D. M. Wagnerová // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2004. – Vol. 248, № 3–4. – P. 321–350.

204. Parkinson, G. N. Structural Basis for Binding of Porphyrin to Human Telomeres / G. N. Parkinson, R. Ghosh, S. Neidle // *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46, № 9. – P. 2390–2397.
205. Monchaud, D. One Ring to Bind Them All—Part I: The Efficiency of the Macrocyclic Scaffold for G-Quadruplex DNA Recognition / D. Monchaud, A. Granzhan, N. Saettel [et al.] // *Journal of Nucleic Acids*. – 2010. – Vol. 2010. – P. 1–19.
206. Monchaud, D. A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands / D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou // *Org. Biomol. Chem.* – 2008. – Vol. 6, № 4. – P. 627–636.
207. Bielskutė, S. Impact of Oxidative Lesions on the Human Telomeric G-Quadruplex / S. Bielskutė, J. Plavec, P. Podbevšek // *Journal of the American Chemical Society*. – 2019. – Vol. 141, № 6. – P. 2594–2603.
208. Elsadek, B. Impact of albumin on drug delivery — New applications on the horizon / B. Elsadek, F. Kratz // *Journal of Controlled Release*. – 2012. – Vol. 157, № 1. – P. 4–28.
209. Li, X. Photodynamic and Photothermal therapy via human serum albumin delivery / X. Li, X. Li, S. Park [et al.] // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2024. – Vol. 520. – P. 216142.
210. Jeong, H. Photosensitizer-Conjugated Human Serum Albumin Nanoparticles for Effective Photodynamic Therapy / H. Jeong, M. Huh, S. J. Lee [et al.] // *Theranostics*. – 2011. – Vol. 1. – P. 230–239.
211. Mattioli, E. J. Carrying Temoporfin with Human Serum Albumin: A New Perspective for Photodynamic Application in Head and Neck Cancer / E. J. Mattioli, L. Ulfo, A. Marconi [et al.] // *Biomolecules*. – 2023. – Vol. 13, № 1. – P. 68.
212. Wardell, M. The Atomic Structure of Human Methemalbumin at 1.9 Å / M. Wardell, Z. Wang, J. X. Ho [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2002. – Vol. 291, № 4. – P. 813–819.
213. Zunszain, P. A. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid / P. A. Zunszain, J. Ghuman, T. Komatsu [et al.] // *BMC Structural Biology*. – 2003. – Vol. 3, № 1. – P. 6.
214. Riyad, Y. M. Chemical Modification of a Tetrapyrrole-Type Photosensitizer: Tuning Application and Photochemical Action beyond the Singlet Oxygen Channel / Y. M. Riyad, S. Naumov, S. Schastak [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2014. – Vol. 118, № 40. – P. 11646–11658.
215. Arora, A. Effect of Loop Orientation on Quadruplex–TMPyP4 Interaction / A. Arora, S. Maiti // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2008. – Vol. 112, № 27. – P. 8151–8159.
216. 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.
217. Martino, L. Shedding Light on the Interaction between TMPyP4 and Human Telomeric Quadruplexes / L. Martino, B. Pagano, I. Fotticchia [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2009. – Vol. 113, № 44. – P. 14779–14786.
218. Zamiri, B. TMPyP4 Porphyrin Distorts RNA G-quadruplex Structures of the Disease-associated r(GGGGCC)_n Repeat of the C9orf72 Gene and Blocks Interaction of RNA-binding Proteins* / B.

Zamiri, K. Reddy, R. B. Macgregor [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289, № 8. – P. 4653–4659.

219. Dixon, D. W. Dimerization of tetracationic porphyrins: ionic strength dependence / D. W. Dixon, V. Steullet // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 1998. – Vol. 69, № 1-2. – P. 25–32.

220. Xodo, L. E. The Chlorophyll Catabolite Pheophorbide a as a Photosensitizer for the Photodynamic Therapy / L. E. Xodo, V. Rapozzi, M. Zacchigna [et al.] // *Current Medicinal Chemistry*. – 2012. – Vol. 19, № 6. – P. 799–807.

221. Bui-Xuan, N.-H. Photo-activated pheophorbide-a, an active component of *Scutellaria barbata*, enhances apoptosis via the suppression of ERK-mediated autophagy in the estrogen receptor-negative human breast adenocarcinoma cells MDA-MB-231 / N.-H. Bui-Xuan, P. M.-K. Tang, C.-K. Wong [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2010. – Vol. 131, № 1. – P. 95–103.

222. Röder, B. Photophysical properties of pheophorbide a in solution and in model membrane systems / B. Röder [et al.] // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. – 2000. – Vol. 4, № 1. – P. 37–44.

223. Yang, C. Mitochondria-targeted tri-triphenylphosphonium substituted meso-tetra(4-carboxyphenyl) porphyrin (TCPP) by conjugation with folic acid and graphene oxide for improved photodynamic therapy / C. Yang, H. Zhang, Z. Wang [et al.] // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. – 2019. – Vol. 23, № 9. – P. 1028–1040.

224. Liu, J. Nanoscale metal–organic frameworks for combined photodynamic & radiation therapy in cancer treatment / J. Liu, Y. Yang, W. Zhu [et al.] // *Biomaterials*. – 2016. – Vol. 97. – P. 1–9.

225. Rehman, F. U. Protective effect of TiO₂ nanowhiskers on Tetra Sulphonatophenyl Porphyrin (TSPP) complexes induced oxidative stress during photodynamic therapy / F. U. Rehman, C. Zhao, H. Jiang [et al.] // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. – 2016. – Vol. 13. – P. 267–275.

226. Neagu, M. Synthetic porphyrins in experimental photodynamic therapy induce a different antitumoral effect / M. Neagu, G. Manda, C. Constantin [et al.] // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. – 2007. – Vol. 11, № 1. – P. 58–65.

227. Lebedeva, N. Sh. The interaction of cationic and anionic porphyrins with the bovine serum albumin in borate buffer / N. Sh. Lebedeva, Y. A. Gubarev, O. I. Koifman // *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. – 2017. – Vol. 88, № 3-4. – P. 191–198.

228. Mahajan, P. G. Synthesis, Photophysical Properties and Application of New Porphyrin Derivatives for Use in Photodynamic Therapy and Cell Imaging / P. G. Mahajan, N. C. Dige, B. D. Vanjare [et al.] // *Journal of Fluorescence*. – 2018. – Vol. 28, № 4. – P. 871–882.

229. Zsila, F. Subdomain IB Is the Third Major Drug Binding Region of Human Serum Albumin: Toward the Three-Sites Model / F. Zsila // *Molecular Pharmaceutics*. – 2013. – Vol. 10, № 5. – P. 1668–1682.

230. Abou-Zied, O. K. Exploring the Drug-Binding Site Sudlow I of Human Serum Albumin: The Role of Water and Trp214 in Molecular Recognition and Ligand Binding / O. K. Abou-Zied, N. Al-Lawatia // *ChemPhysChem*. – 2011. – Vol. 12, № 2. – P. 270–274.

231. An, W. Spectroscopic and molecular modeling of the binding of meso-tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrin to human serum albumin / W. An, Y. Jiao, C. Dong [et al.] // *Dyes and Pigments*. – 2009. – Vol. 81, № 1. – P. 1–9.

232. Joshi, S. Porphyrin induced structural destabilization of a parallel DNA G-quadruplex in human MRP1 gene promoter / S. Joshi, A. Singh, S. Kukreti // *Journal of Molecular Recognition*. – 2022. – Vol. 35, № 3. – P. 2950.
233. Martinez De Pinillos Bayona, A. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers / A. Martinez De Pinillos Bayona, P. Mroz, C. Thunshelle [et al.] // *Chemical Biology and Drug Design*. – 2017. – Vol. 89, № 2. – P. 192–206.
234. Kollar, J. Cationic Versus Anionic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy: What a Difference the Charge Makes / J. Kollar, M. Machacek, M. Halaskova [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 63, № 14. – P. 7616–7632.
235. He, H. Programmable therapeutic nanoscale covalent organic framework for photodynamic therapy and hypoxia-activated cascade chemotherapy / H. He, L. Du, H. Xue [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2022. – Vol. 149. – P. 297–306.
236. Nawalany, K. Novel nanostructural photosensitizers for photodynamic therapy: In vitro studies / K. Nawalany, A. Rusin, M. Kepczynski [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2012. – T. 430, № 1. – P. 129–140.
237. Bao, H.-L. Hybrid-type and two-tetrad antiparallel telomere DNA G-quadruplex structures in living human cells / H.-L. Bao, H. Liu, Y. Xu // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Vol. 47, № 10. – P. 4940–4947.
238. Keller, K. Averaging of nuclear modulation artefacts in RIDME experiments / K. Keller, A. Doll, M. Qi [et al.] // *J. Magn. Reson.* – 2016. – Vol. 272. – P. 108–113.
239. Qin, P. Z. Measuring nanometer distances in nucleic acids using a sequence-independent nitroxide probe / P. Z. Qin, I. S. Haworth, Q. Cai [et al.] // *Nature Protocols*. – 2007. – Vol. 2, № 10. – P. 2354–2365.
240. Zhang, X. Conformations of Human Telomeric G-Quadruplex Studied Using a Nucleotide-Independent Nitroxide Label / X. Zhang, C.-X. Xu, R. Di Felice [et al.] // *Biochemistry*. – 2016. – Vol. 55, № 2. – P. 360–372.
241. Xu, C.-X. Stabilization of Human Telomeric G-Quadruplex and Inhibition of Telomerase Activity by Propeller-Shaped Trinuclear Pt II Complexes / C.-X. Xu, Y. Shen, Q. Hu [et al.] // *Chemistry - An Asian Journal*. – 2014. – Vol. 9, № 9. – P. 2519–2526.
242. Parkinson, G. N. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA / G. N. Parkinson, M. P. H. Lee, S. Neidle // *Nature*. – 2002. – Vol. 417, № 6891. – P. 876–880.
243. Ambrus, A. Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution / A. Ambrus, D. Chen, J. Dai [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – Vol. 34, № 9. – P. 2723–2735.
244. Singh, V. Human Telomeric Quadruplex Conformations Studied by Pulsed EPR / V. Singh, M. Azarkh, T. E. Exner [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2009. – Vol. 48, № 51. – P. 9728–9730.
245. Ma, Y. Topologies of G-quadruplex: Biological functions and regulation by ligands / Y. Ma, K. Iida, K. Nagasawa // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2020. – Vol. 531, № 1. – P. 3–17.

246. Nicoludis, J. M. Interaction of human telomeric DNA with N-methyl mesoporphyrin IX / J.M. Nicoludis, S. P. Barrett, J.-L. Mergny [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2012. – Vol. 40, № 12. – P. 5432–5447.
247. Han, H. Selective Interactions of Cationic Porphyrins with G-Quadruplex Structures / H. Han, D. R. Langley, A. Rangan [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2001. – Vol. 123, № 37. – P. 8902–8913.
248. Zheng, X. H. TMPyP4 promotes cancer cell migration at low doses, but induces cell death at high doses / X. H. Zheng, X. Nie, H. Y. Liu [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6, № 1–P.26592
249. Cadet, J. Singlet oxygen oxidation of isolated and cellular DNA: product formation and mechanistic insights / J. Cadet, J. L. Ravanat, G. R. Martinez [et al.] // *Photochemistry and photobiology*. – 2006. – Vol. 82, № 5. – P. 1219–1225
250. Stoll, S. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR / S. Stoll, A. Schweiger // *J. Magn. Reson.* – 2006. – Vol. 178. – P.42–55.
251. Sadybekov, A. V. Computational approaches streamlining drug discovery / A. V. Sadybekov, V. Katritch // *Nature*. – 2023. – Vol. 616, № 7958. – P. 673–685.
252. Huth, S. W. μ Map Photoproximity Labeling Enables Small Molecule Binding Site Mapping / S. W. Huth, J. V. Oakley, C. P. Seath [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2023. – Vol. 145, № 30. – P. 16289–16296.
253. Long, K. S. Resistance to Linezolid Caused by Modifications at Its Binding Site on the Ribosome / K. S. Long, B. Vester // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2012. – Vol. 56, № 2. – P. 603–612.
254. Yang, W.-C. Grasping cryptic binding sites to neutralize drug resistance in the field of anticancer / W.-C. Yang, D.-H. Gong, Hong Wu [et al.] // *Drug Discovery Today*. – 2023. – Vol. 28, № 9. – P. 103705.
255. Kolokolov, M. Enhanced Binding Site Identification in Protein–Ligand Complexes with a Combined Blind Docking and Dipolar Electron Paramagnetic Resonance Approach / M. Kolokolov, N. Sannikova, S. Dementev [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2025. – Vol. 147, № 16. – P. 13677–13687.
256. Chuang, V. T. G. Human Serum Albumin in Blood Detoxification Treatment / V. T. G. Chuang, T. Maruyama, M. Otagiri // *Albumin in Medicine: Pathological and Clinical Applications*. – Singapore : Springer Singapore, 2016. – P. 209–225.
257. Kragh-Hansen, U. Human serum albumin: a multifunctional protein / U. Kragh-Hansen // *Albumin in medicine: pathological and clinical applications*. – Singapore : Springer Singapore, 2016. – P. 1–24.
258. Chubarov, A. S. Serum Albumin for Magnetic Nanoparticles Coating / A. S. Chubarov // *Magnetochemistry*. – 2022. – Vol. 8, № 2. – P. 13.
259. Tormyshev, V. M. Methanethiosulfonate Derivative of OX063 Trityl: A Promising and Efficient Reagent for Side-Directed Spin Labeling of Proteins / V. M. Tormyshev, A. S. Chubarov, O. A. Krumkacheva [et al.] // *Chemistry - A European Journal*. – 2020. – Vol. 26, № 12. – P. 2705–2712.

260. Funk, W. E. Enrichment of cysteinyl adducts of human serum albumin / W. E. Funk, H. Li, A. T. Iavarone [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 2010. – Vol. 400, №1. – P. 61–68.
261. Park, D. S. Expression of a Human Serum Albumin Fragment (Consisting of Subdomains IA, IB, and IIA) and a Study of Its Properties / D. S. Park, C. E. Petersen, C.-E. Ha [et al.] // *IUBMB Life*. – 1999. – Vol. 48, № 2. – P. 169–174.
262. Pantusa, M. Spectroscopic and calorimetric studies on the interaction of human serum albumin with DPPC/PEG:2000-DPPE membranes / M. Pantusa, L. Sportelli, R. Bartucci // *European Biophysics Journal*. – 2008. – Vol. 37, № 6. – P. 961–973.
263. Harohalli, K. Site-directed mutagenesis studies of human serum albumin define tryptophan at amino acid position 214 as the principal site for nitrosation / K. Harohalli, C. E. Petersen, C.-E. Ha [et al.] // *Journal of Biomedical Science*. – 2002. – Vol. 9, № 1. – P. 47–58..
264. Andrade, S. M. Spectroscopic Studies on the Interaction of a Water Soluble Porphyrin and Two Drug Carrier Proteins / S. M. Andrade, S. M. B. Costa // *Biophysical Journal*. – 2002. – Vol. 82, № 3. – P. 1607–1619.
265. Szafraniec, M. J. One ring is not enough to rule them all. Albumin-dependent ABCG2-mediated transport of chlorophyll-derived photosensitizers / M. J. Szafraniec, L. Fiedor // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2021. – Vol. 167. – P. 106001.
266. An, W. Spectroscopic and molecular modeling of the binding of meso-tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrin to human serum albumin / W. An, Y. Jiao, C. Dong [et al.] // *Dyes and Pigments*. – 2009. – Vol. 81, № 1. – P. 1–9.
267. Ouyang, D. Tetrakis (N-methyl-p-pyridinio) porphyrin and its zinc complex can photosensitize damage of human serum albumin through electron transfer and singlet oxygen generation / D. Ouyang, S. Inoue, S. Okazaki, K. Hirakawa // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. – 2016. – Vol. 20, № 7. – P. 813–821.
268. Udrea, A.-M. Target Prediction of 5,10,15,20-Tetrakis(4'-Sulfonatophenyl)-Porphyrin Using Molecular Docking / A.-M. Udrea, A. Dinache, A. Staicu [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14, № 11. – P. 2390.
269. Rinco, O. The effect of porphyrin structure on binding to human serum albumin by fluorescence spectroscopy / O. Rinco, J. Brenton, A. Douglas [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2009. – Vol. 208, №2-3. – P. 91–96.
270. Sułkowski, L. Characteristics of the Protoporphyrin IX Binding Sites on Human Serum Albumin Using Molecular Docking / L. Sułkowski, B. Pawełczak, M. Chudzik [et al.] // *Molecules*. – 2016. – Vol. 21, № 11. – P. 1519.
271. Weert, M. van de Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology / M. van de Weert, L. Stella // *Journal of Molecular Structure*. – 2011. – Vol. 998, № 1. – P. 144–150.
272. Bunin, D. A. Robust route toward cationic phthalocyanines through reductive amination / D. A. Bunin, A. G. Martynov, E. A. Safonova [et al.] // *Dyes and Pigments*. – 2022. – Vol. 207. – P. 110768.
273. Sannikova, N. E. Sensitivity optimization in pulse EPR experiments with photo-labels by multiple-echo-integrated dynamical decoupling / N. E. Sannikova, A. R. Melnikov, S. L. Veber, O. A.

Krumkacheva, M. V. Fedin // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2023. – Vol. 25, № 17. – P. 11971–11980.

274. Born, A. Reconstruction of Coupled Intra- And Interdomain Protein Motion from Nuclear and Electron Magnetic Resonance / A. Born, J. Soetbeer, F. Breitgoff [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2021. – T. 143, № 39. – P. 16055–16067.

275. Kay, C. W.M. The Electronic Structure of the Photoexcited Triplet State of Free-Base(Tetraphenyl)porphyrin by Time-Resolved Electron-Nuclear Double Resonance and Density Functional Theory / C. W. M. Kay // Journal of the American Chemical Society. – 2003. – Vol. 125, № 45. – P. 13861–13867.