

Утверждаю:  
Заместитель директора  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института проблем химической физики  
Российской академии наук  
доктор химических наук



Э.Р. Бадамшина

« 12 » сентября 2014 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу **Лисицыной Екатерины Сергеевны**  
**«Образование комплексов красителей с ДНК и их взаимодействие с наночастицами  
золота»**, представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук  
по специальности 02.00.04 – физическая химия

**Актуальность темы диссертации.** Красители порфиринового и цианинового семейств широко используются в биологии и медицине, а возможность образования комплексов данных красителей с ДНК является основой их применения в качестве флуоресцентных зондов или в качестве ДНК-направленных терапевтических агентов. Порфириновые производные могут служить перспективными противораковыми агентами в фотодинамической терапии, при этом отдельную группу представляют порфириновые фотосенсибилизаторы, локализующиеся в ядре опухолевых клеток, действие которых основано на связывании с ДНК. Цианиновые красители нашли применение в качестве флуоресцентных зондов в различных аналитических методах, например, для определения концентраций биомакромолекул, главным образом, ДНК. Несмотря на то, что выбранный для исследования в данной работе краситель SYBRGreen (SG) активно используется биологами и биохимиками в качестве ДНК-специфического зонда, механизм его взаимодействия с ДНК и концентрационные пределы его применения недостаточно изучены. Таким образом, исследование самотушения данного красителя является очень важным. Наночастицы металлов интенсивно изучаются в настоящее время, так как они обладают уникальными оптическими, электронными и химическими свойствами и могут применяться во многих областях науки и техники, например, для обнаружения биомакромолекул, доставки лекарственных препаратов, фототермической терапии опухолей, а также в нанолитографии и катализе. В литературе описаны различные механизмы взаимодействия наночастиц золота с ДНК и красителями, которые зависят от

природы красителей и наночастиц, микроокружения и многих других факторов и являются основой множества их применений. Таким образом, актуальность темы диссертации **Лисицыной Е.С.** сомнений не вызывает.

Исследования, проведенные в работе, направлены на решение нескольких **задач**:

- изучить влияние размера заместителей и наличия координированного металла в ядре тетрафенилпорфиринов на спектрально-кинетические характеристики их комплексов с ДНК;
- исследовать процессы самотушения флуоресценции красителя SYBRGreen в системах на основе ДНК с различной степенью молекулярной организации и выяснить механизм данного явления;
- изучить процесс комплексообразования в тройной системе, включающей краситель SYBRGreen, ДНК и наночастицы золота;
- определить спектрально-кинетические характеристики тройных систем на основе комплексов красителя SYBRGreen и молекул ДНК и наночастиц золота.

Диссертационная работа состоит из введения пяти глав, выводов и списка литературы.

Во **введении** обоснована актуальность выбранной темы, поставлена цель и определены задачи работы, выделена новизна и практическая значимость полученных в работе результатов и отмечен личный вклад автора и степень апробации работы.

**Первая глава** содержит подробный обзор литературы по теме диссертации, рассмотрена современная литература о возможных типах комплексов ДНК, соединений-лигандов и значении комплексообразования в различных фотохимических и фотобиологических процессах. Представлены подробные данные о двух исследованных в работе классах красителей, таких как катионные тетрафенилпорфирины (ТФП) и цианиновые красители, описано их комплексообразование с ДНК и агрегация на биополимере, а также значение и возможные применения в биологии и медицине. Проведен анализ литературы по наночастицам золота различных размеров и форм, а также их физико-химическим свойствам и применениям. Рассмотрены различные возможные механизмы взаимодействия наночастиц золота с ДНК и флуорофорами.

Во **второй главе** описаны объекты исследования и протоколы приготовления образцов. Приведены теоретические основы использованных в работе спектральных и кинетических методов исследования.

**Третья глава** посвящена спектральному исследованию комплексообразования катионных ТФП с ДНК методами абсорбционной спектроскопии, кругового дихроизма и время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии.

В **четвертой главе** приведены результаты изучения концентрационного тушения цианинового красителя SG при комплексообразовании с ДНК в растворе, а также в составе конденсированных форм ДНК (жидкокристаллических дисперсий).

В **пятой главе** обсуждается эффект супертушения красителя SG наночастицами золота в среде ДНК, который заключается в эффективном тушении флуоресценции красителя с высокой константой Штерна-Фольмера ( $K_{SV} > 10^7$ ). Рассмотрены различные модели взаимодействия наночастиц золота и SG.

На защиту выносятся следующие **основные положения**:

1. Увеличение стерических затруднений в молекуле порфирина (удлинение метиленового спейсера и введение металла) препятствует комплексообразованию красителя с ДНК и приводит к преобладанию менее прочного типа комплекса залегания по малой бороздке ДНК над более стабильным интеркаляционным типом комплекса.
2. При высоких уровнях заполнения ДНК красителем SG в дополнение к интеркаляционному комплексу происходит образование ассоциата красителя в малой бороздке ДНК.
3. В упорядоченных системах на основе ДНК осуществляется эффект самотушения флуоресценции красителя SG по механизму резонансного переноса энергии (hetero-FRET) с возбужденного состояния красителя на нефлуоресцирующий ассоциат красителя.
4. Эффект супертушения флуоресценции красителя SG под действием наночастиц золота в растворе ДНК обусловлен, главным образом, статическим тушением за счёт кооперативного связывания наночастиц золота с SG, интеркалированным в ДНК, с образованием нефлуоресцирующего комплекса ДНК/SG/Au<sub>3</sub>.

Сделанные по работе общие **выводы** объективно отражают основное содержание диссертации и полностью соответствуют поставленным целям и задачам.

**Научная новизна** рассматриваемой работы состоит в том, что автором впервые проведено исследование комплексообразования новых синтетических катионных тетрафенилпорфириновых красителей с двухцепочечной ДНК, определены эффективные константы комплексообразования и установлена способность исследуемых ТФП образовывать два типа комплексов с нуклеиновой кислотой (интеркаляционный и внешний, в малой бороздке). Установлена корреляция между структурой тетрафенилпорфиринов и их способностью связываться с ДНК, а также характером их

связывания с ДНК. Впервые обнаружен эффект самотушения флуоресценции красителя SYBRGreen в молекулярно-организованных структурах на основе ДНК, и в качестве механизма данного эффекта подтвержден резонансный перенос энергии (hetero-FRET) с возбужденного состояния красителя на нефлуоресцирующий ассоциат красителя. **Лисицыной Е.С.** обнаружена способность исследуемых наноразмерных ( $d \sim 2,5$  нм) наночастиц золота эффективно тушить флуоресценцию красителя SYBRGreen на матрице ДНК («супертушение»), и впервые установлен механизм этого явления. Показано, что кооперативное связывание наночастиц золота с красителем, интеркалированным в ДНК, с образованием нефлуоресцирующего комплекса обуславливает явление «супертушения» флуоресценции небольших мономерных флуорофоров наночастицами НЧ золота, природа которого до настоящего времени оставалась малоизученной.

**Практическая значимость** работы заключается в возможности использования связи структуры катионных производных порфиринов и типа комплекса, который они образуют с ДНК, в качестве критерия отбора перспективных соединений для дальнейшего использования в фототерапии рака. Исследование процессов самотушения цианинового красителя SYBRGreen, проведенное автором в диссертационной работе, дает представление о концентрационном диапазоне, в котором можно осуществлять корректные флуоресцентные измерения. С другой стороны, изучение самотушения красителя SYBRGreen в конденсированных системах открывает новую область применения данного красителя в качестве детектора конденсации-деконденсации биополимера ДНК. Обнаруженный эффект супертушения флуоресценции красителя SYBRGreen наночастицами золота в водном растворе ДНК может стать основой для разработки высокочувствительных сенсоров, работающих на принципе тушения флуоресценции. Установленный автором механизм супертушения расширяет фундаментальные представления о взаимодействии наночастиц с низкомолекулярными флуорофорами. Знание этого механизма позволит успешно управлять работой сенсорных систем на основе подобных красителей и наночастиц и подбирать оптимальные варианты флуорофоров и тушителей для них.

**Достоверность результатов** обеспечивается использованием высокочувствительных, информативных и апробированных современных физико-химических методов и сомнения не вызывает. Результаты согласуются с данными, полученными ранее другими авторами, и неоднократно докладывались и обсуждались на всероссийских и международных симпозиумах и конференциях. По материалам диссертации опубликованы 4 статьи в рецензируемых журналах, 2 из которых в российских изданиях рекомендованных ВАК и 2

в международных журналах, а также 6 тезисов докладов конференций, в подготовке которых автор принимал непосредственное и основное участие.

Наряду с перечисленными выше достоинствами работы следует отметить некоторые **недостатки и замечания**.

1. В работе используется большое количество аббревиатур, часть из которых появляется, но не вводится по тексту (дц-ДНК – стр.7, ТРyPP и ТРyPP(Ni) – стр.18, ЛД – стр.20), другие появляются и используются значительно раньше, чем вводятся (ТФР – стр.7 и стр.41, КД – стр.17 и стр.46, соответственно), некоторые вводятся несколько раз (ФДТ – стр.5 и 16, ФС – стр. 5 и 16, НЧ – стр.6 и 32). Вообще, для облегчения чтения материала, было бы неплохо иметь лист со списком используемых сокращений.

2. Полученные значения констант комплексообразования справедливо приводятся с указанием точности их определения, однако описание методики вычисления экспериментальных ошибок в разделе 2.2 «Методы» отсутствует.

3. Изложение полученных экспериментальных данных в некоторых разделах чрезвычайно утомительно своим, практически стереотипным, однообразием (см., например, раздел 3.1 «Спектрофотометрическое исследование взаимодействия катионных производных тетрафенилпорфиринов с ДНК»), причем полученные значения констант в этом небольшом кусочке текста упоминаются по несколько раз (при получении, в таблице, обсуждении и в заключении).

Однако эти замечания носят технический характер, не снижают ценности полученных результатов и общей положительной оценки работы, которая может быть рекомендована для использования в ряде исследовательских институтов и организаций: Институте химической физики РАН, Институте физической химии РАН, Российском химико-технологическом университете Д.И. Менделеева, Центре фотохимии РАН.

### **Заключение**

Диссертационная работа **Лисицыной Е.С.** «Образование комплексов красителей с ДНК и их взаимодействие с наночастицами золота» представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу, содержащую решение задачи определения физико-химических параметров комплексообразования красителей с ДНК, а также исследования природы взаимодействий в тройных системах «краситель/ДНКнаночастицы золота», что имеет фундаментальное значение для развития соответствующей области знаний и может стать основой для практического использования объектов исследования. Работа выполнена на современном уровне, материал изложен логично, выводы обоснованы. В диссертации

присутствуют необходимые ссылки на работы, выполненные диссертантом в соавторстве, заимствованные материалы и результаты без ссылок на авторов и источник заимствования отсутствуют. Автореферат диссертации адекватно отражает содержание диссертационной работы, которая полностью соответствует специальности 02.00.04 – физическая химия. По актуальности поставленных задач, новизне, практической и теоретической значимости результатов, количеству и уровню публикаций основных положений диссертация **Лисицной Е.С.** соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года, а ее автор – **Лисицына Екатерина Сергеевна** заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.04 – физическая химия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании семинара отдела нанофотоники Института проблем химической физики РАН 12 сентября 2014 года, протокол № 185-14.

Заведующий отделом нанофотоники  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института проблем химической физики  
Российской академии наук  
доктор химических наук

Почтовый адрес:  
142432, Московская область,  
Ногинский район, город Черноголовка,  
проспект академика Семенова, 1.  
Телефон: 8(49652)21903  
E-mail: [brichkin@icp.ac.ru](mailto:brichkin@icp.ac.ru)

Бричкин Сергей Борисович

