

**УТВЕРЖДАЮ**

Проректор Национального  
исследовательского Томского  
государственного  
университета по научной работе,  
профессор  
И.В. Ивонин

« 12 »



2017 г.

### **ОТЗЫВ**

ведущей организации на диссертационную работу Алиевой Розы Ринаатовны  
«Влияние внешних физико-химических факторов на спектрально-люминесцентные свойства разряженного фотопротейна обелина»,  
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.01.02 – биофизика

Флуоресцентные белки широко используются в качестве генетически кодируемых маркеров для мечения отдельных молекул, внутриклеточных структур, живых клеток и целых организмов, с целью визуализации внутриклеточных процессов, например, взаимодействия белков, их локализации и транспорта. Кроме используемых в таких задачах зеленых флуоресцентных белков (GFP), к группе флуоресцентных белков относятся и целентерамид-содержащие белки, которые присутствуют в светящихся морских кишечнополостных. Их флуорофором является молекула целентерамида (ЦЛМ), связанная нековалентно с белком внутри его гидрофобной полости. ЦЛМ-содержащие флуоресцентные белки являются продуктами биолюминесцентных реакций кишечнополостных. В ходе этих реакций фотопротейн (комплекс белка с 2-гидропероксицелентеразином) в присутствии ионов кальция «разряжается» с испусканием кванта света. Поэтому ЦЛМ-содержащие флуоресцентные белки принято называть «разряженными фотопротейнами». В отличие от GFP-подобных белков, разряженные фотопротейны не получили такого широкого распространения в биомедицинских исследованиях, и их потенциал в качестве флуоресцентных биомаркеров в настоящее время требует подробного изучения.

Спектры биолюминесценции и фотолюминесценции фотопротейнов широкие, асимметричные и включают несколько компонент (эммиттеров), соответствующих различным формам ЦЛМ. Соотношение компонент может меняться под действием различных факторов. Такие изменения связаны с

химией возбужденных состояний, а именно, с эффективностью переноса протона от фенольной группы ЦЛМ к протоно-акцепторной группе аминокислотного окружения в белке. Особый интерес представляет фотопроtein обелин, выделенный из гидроидного полипа *Obelia longissima*, для которого получены генетически модифицированные формы с различными характеристиками биолюминесценции. Однако до настоящего времени не изучена возможность варьирования спектров фотолюминесценции разряженного обелина под действием различных физико-химических факторов, таких как экзогенные соединения, повышенная температура и энергия фотовозбуждения.

Диссертация Алиевой Р.Р. посвящена выявлению закономерностей варьирования спектров флуоресценции разряженного фотопротеина обелина при изменении энергии фотовозбуждения и воздействии ряда деструктивных физико-химических факторов – экзогенных соединений, повышенной температуры, процесса лиофилизации, и такая тема диссертации, несомненно, является актуальной.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи: изучена зависимость флуоресцентных характеристик разряженных фотопротеинов от энергии фотовозбуждения; проведен экспериментальный и теоретический анализ флуоресцентных свойств флуорофора разряженных фотопротеинов – молекулы ЦЛМ при различных энергиях фотовозбуждения; выявлены зависимости спектральных характеристик флуоресценции разряженного обелина (интенсивности и вклада спектральных компонент) от концентрации экзогенных соединений – этанола, этиленгликоля, глицерина, ДМСО; определены зависимости спектральных характеристик флуоресценции разряженного обелина (интенсивности и вклада спектральных компонент) от времени хронического воздействия повышенной температуры (40 °С); варибельность спектров флуоресценции разряженного обелина под действием деструктивных физико-химических факторов (экзогенных соединений, температуры, процесса лиофилизации) связана с изменением эффективности переноса протона в возбужденном состоянии флуорофора (ЦЛМ).

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка цитированной литературы, включающего 144 наименования и приложений. *Первая глава* диссертационной работы посвящена критическому обзору литературы по теме диссертации. В ней рассмотрены структурные особенности, свойства и применение флуоресцентных белков (GFP, GFP-подобных и целентерамид-содержащих), продемонстрированы отличия разряженного обелина от других флуоресцентных белков. Описаны способы

получения разряженных фотопротеинов. Проанализированы имеющиеся в настоящее время теоретические и экспериментальные исследования флуоресцентных свойств продукта билюминесцентной реакции обелина (разряженного обелина) и его флуорофора (ЦЛМ), а также гипотезы о механизме образования эмиттеров люминесценции фотопротеинов. Описаны флуоресцентные свойства ароматических аминокислот, присутствующих в белках. Проанализированы механизмы действия экзогенных соединений на свечение ферментативных систем. Показаны перспективы использования флуоресценции разряженного обелина, обоснована необходимость изучения его спектральных свойств.

*Вторая глава* работы посвящена методике эксперимента и методам квантово-химических расчетов. В ней представлен список реагентов, описана методика приготовления образцов, приведен перечень приборов, на которых производились спектрометрические измерения, описано разделение спектров на компоненты.

*В третьей главе* приведены результаты исследования влияния длины волны фотовозбуждения на флуоресценцию разряженного фотопротеина обелина и его флуорофора ЦЛМ. Продемонстрировано, что спектры флуоресценции разряженных фотопротеинов (обелина, акворина, клитина) и их флуорофора (ЦЛМ) зависят от энергии возбуждения: при фотовозбуждении в высшие электронно-возбужденные состояния (260-300 нм) возникает дополнительное излучение в ближней ультрафиолетовой области с максимумами от 330 нм до 350 нм. Квантово-химические расчеты показали, что ультрафиолетовое излучение в спектрах флуоресценции молекулы ЦЛМ формируются с участием пиразинового, фенольного и бензольного фрагментов ЦЛМ. В процесс формирования ультрафиолетовой флуоресценции ЦЛМ вовлечены электронные переходы с участием вакантных и занятых молекулярных орбиталей разных энергий – НВМО+1, ВЗМО, ВЗМО-2, ВЗМО-3. Эти переходы могут вносить вклад в ультрафиолетовую флуоресценцию разряженных фотопротеинов. На примере обелина установлено, что ультрафиолетовое излучение разряженных фотопротеинов может формироваться не только за счет флуоресценции аминокислотных остатков белка, но и флуорофора (ЦЛМ).

*Четвертая глава* работы посвящена изучению воздействий на флуоресценцию разряженного обелина ряда физико-химических факторов – экзогенных веществ (этанола, этиленгликоля, глицерина и ДМСО) и повышенной температуры. Исследовано воздействие на разряженный обелин, полученный из свежеприготовленного и лиофилизированного

препаратов фотопротеина, поэтому процесс лиофилизации может быть рассмотрен как дополнительный физико-химический фактор.

Научную новизну работы определяет тот факт, что в ней впервые показано, что такие физико-химические факторы, как повышенная температура, воздействие экзогенных соединений, процесс лиофилизации препарата изменяют характеристики фотолюминесценции разряженного обелина в видимой области спектра, а именно: 1) уменьшают интенсивность, 2) изменяют спектральный состав, увеличивая вклад фиолетовой и уменьшая вклад сине-зеленой компонент флуоресценции. Вышеперечисленные факторы также изменяют интенсивность и вклад ультрафиолетовой компоненты. Эти изменения связаны с частичной денатурацией обелина, приводящей к уменьшению эффективности переноса протона в возбужденном состоянии ЦЛМ в белке, а также изменению пространственного положения боковых групп аминокислотных остатков (прежде всего, триптофановых), способных вносить вклад в ультрафиолетовую флуоресценцию разряженного обелина.

Достоверность полученных результатов обеспечивается применением широкого набора методов исследования, таких как флуориметрический, спектрофотометрический, биохимический и квантово-химический. Экспериментальные исследования выполнены на сертифицированном оборудовании. Для теоретических расчетов и обработки экспериментальных данных использованы современные модели и лицензионные программы. Полученные результаты и их интерпретация не противоречат современным научным представлением о закономерностях физико-химических процессов в биологических макромолекулах.

Полученные новые знания обладают практической значимостью, и в первую очередь тем, что выявленная вариабельность спектров флуоресценции разряженного обелина является основой для разработки новых цветовых биомедицинских маркеров, а также понимания функционирования уже имеющихся. Интенсивность флуоресценции разряженного обелина и соотношение вкладов фиолетовой и сине-зеленой компонент флуоресценции автором предложено использовать в качестве количественных оценок степени деструкции разряженного обелина. Этот подход может лечь в основу создания нового типа биотестов на токсическое действие экзогенных соединений – биотестов с цветовой дифференциацией. Т.к. биолюминесценция обелина уже применяется для определения содержания кальция и мониторинга кальций-зависимых процессов, использование продукта биолюминесцентной реакции (разряженного обелина) для флуоресцентного биотестирования токсичности способно

придать препарату обелина многофункциональность и повысить эффективность его использования. Поскольку оптимальная температура функционирования фотопротейна обелина, выделенного из гидроидного полипа *Obelia longissima* (обитателя северных морей), менее 20 °С, необходимо учитывать изменение интенсивности и цвета фотолюминесценции при использовании его в качестве флуоресцентной метки в теплокровных организмах.

Оценивая работу в целом, необходимо подчеркнуть, что полученные и детально проанализированные автором результаты характеризуются новизной, приоритетностью и оригинальностью. Тем не менее, отметим ряд недостатков диссертационной работы:

1. При обсуждении свойств соединений, используемых в криобиологии (с. 48 диссертации) хотелось бы более подробного обсуждения, почему криопротекторы снижают силу водородных связей.
2. Эффективность тушения флуоресценции разряженного обелина, полученного из лиофилизированного препарата обелина, экзогенными соединениями оказалась даже выше, чем свежеприготовленного (с. 74). Желательно было бы более подробно описать причины такого влияния процесса лиофилизации на излучательные процессы.
3. На с. 79-80 диссертации при обсуждении возможности биотестирования не совсем ясно, как именно мониторинг токсичности в данном случае связан с оценкой изменения эффективности элементарного фотохимического процесса – переноса протона в возбужденном состоянии флуорофора разряженного обелина, ЦЛМ.

Отмеченные недостатки ни в коей мере не снижают общего впечатления о диссертационной работе как о квалифицированном научном труде высокого уровня. Автореферат диссертации соответствует ее содержанию.

Результаты диссертационной работы Алиевой Р.Р. следует рекомендовать для использования в организациях, занимающихся исследованиями в области биофизики, физической химии, молекулярной спектроскопии, фотохимии и фотофизики молекул, в НИФХИ им. Л.Я. Карпова, в Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова, в Национальном исследовательском Томском государственном университете и др.

Диссертация Алиевой Р.Р. соответствует специальности 03.01.02 – биофизика. Представленная диссертация полностью удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, в редакции с

изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335 «О внесении изменений в положение о присуждении ученых степеней». Материалы диссертации прошли апробацию на международных конференциях, опубликованы 6 статей в журналах, входящих в перечень ВАК. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертации. Все это позволяет заключить, что Алиева Роза Ришатовна несомненно достойна присуждения ей искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Отзыв рассмотрен и одобрен на объединенном научном семинаре лаборатории фотофизики и фотохимии молекул физического факультета ТГУ и лаборатории органической электроники ОСП СФТИ (протокол № 1 от 9 января 2017 г.).

Отзыв составил:

Ведущий научный сотрудник лаб.  
фотофизики и фотохимии молекул ТГУ,  
доктор физико-математических наук,  
профессор кафедры физической  
и коллоидной химии

Соколова Ирина Владимировна

Соколова Ирина Владимировна  
доктор физико-математических наук, 01.04.05 – оптика, профессор по кафедре физической и коллоидной химии, ведущий научный сотрудник лаборатории фотофизики и фотохимии молекул Национального исследовательского Томского государственного университета, 634050, г. Томск, пр. Ленина 36, sokolova@phys.tsu.ru, тел. 8(3822)533426.

