

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

о соответствии диссертационной работы «Влияние внешних физико-химических факторов на спектрально-люминесцентные свойства разряженного фотопротеина обелина» Алиевой Розы Рашатовны профилю диссертационного совета Д 002.039.01 и требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям

Комиссия в составе д.х.н. Трофимова А.В., д.ф.м.н., профессора Тихонова А.Н., д.б.н. Дудник Л.Б. констатирует, что диссертационная работа «Влияние внешних физико-химических факторов на спектрально-люминесцентные свойства разряженного фотопротеина обелина» по теме, постановке задач, методам исследования и полученным результатам соответствует специальности 03.01.02 – биофизика (биологические науки).

Комиссия отмечает следующие основные научные результаты диссертационной работы и ее новизну:

В диссертационной работе Алиевой Р.Р. установлено, что спектры флуоресценции разряженных фотопротеинов (обелина, акворина, клитина) и свободного целентерамида зависят от энергии возбуждения: при фотовозбуждении в высшие электронно-возбужденные состояния возникает дополнительное излучение в ближней ультрафиолетовой области с максимумами 330-350 нм.

Определена природа ультрафиолетового излучения. Проведенные квантово-химические расчеты показали, что ультрафиолетовое излучение в спектрах флуоресценции молекулы целентерамида формируются с участием пиразинового, фенольного и бензольного фрагментов. Описаны электронные переходы, вовлеченные в этот процесс. Высказано предположение, что ультрафиолетовое излучение целентерамида может вносить вклад в ультрафиолетовую флуоресценцию разряженных фотопротеинов. Рассчитан квантовый выход флуоресценции целентерамида в метаноле, который оказался равным $0,028 \pm 0,005$ в интервале длин волн фотовозбуждения 270-340 нм.

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 целентерамида 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.

Диссертационная работа Р.Р. Алиевой представляет собой цельное и структурированное научное исследование, выполненное на высоком экспериментальном и теоретическом уровне.

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. Объем экспериментального материала, взаимосогласованность результатов и

комплексное использование вышеперечисленных физико-химических методов исследования обеспечивают надежность и достоверность полученных в работе данных. Полученные результаты и их интерпретация не противоречат современным научным представлениям о закономерностях физико-химических процессов в биологических макромолекулах.

Практическая и научная значимость результатов диссертационной работы

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 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 на основе целентерамид-содержащих флуоресцентных белков. 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 multifunctionality и повысить эффективность его использования.

Поскольку оптимальная температура функционирования фотопротеина 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.

Основные результаты диссертационной работы изложены в статьях автора, опубликованных в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК:

1. Alieva, R.R. Ultraviolet fluorescence of coelenteramide and coelenteramide-containing fluorescent proteins. Experimental and theoretical study / R.R. Alieva, F.N. Tomilin, A.A. Kuzubov, S.G. Ovchinnikov, N.S. Kudryasheva // Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology. – 2016. – V. 162. – P. 318-323.

2. Петрова, А.С. Варьирование спектральных характеристик целентерамид-содержащего флуоресцентного белка из *Obelia longissima* под воздействием диметилсульфоксида / А.С. Петрова, Р.Р. Алиева, Н.В. Белогурова, Л.С. Тирранен, Н.С. Кудряшева // Известия Высших учебных заведений. Физика. – 2016. – Т. 59, № 4. – С. 87-92. (Petrova, A.S. Variation of spectral characteristics of coelenteramide-containing fluorescent protein from *Obelia longissima* exposed to dimethyl sulfoxide / A.S. Petrova, R.R. Alieva, N.V. Belogurova, L.S. Tirranen, N. S. Kudryasheva // Russian Physics Journal. – 2016. – V. 59, № 4. – P. 562-567.)

3. Alieva, R.R. Effects of alcohols on fluorescence intensity and color of a discharged-obelin-based biomarker / R.R. Alieva, N.V. Belogurova, A.S. Petrova, N.S. Kudryasheva // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2014. – V. 406, № 12. – P. 2965-2974.

4. Alieva, R.R. Fluorescence properties of Ca²⁺-independent discharged obelin and its application prospect / R.R. Alieva, N.V. Belogurova, A.S. Petrova, N.S. Kudryasheva // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2013. – V. 405, № 10. – P. 3351-3358.

5. Belogurova, N.V. Activity of upper electron-excited states in bioluminescence of coelenterates / N.V. Belogurova, R.R. Alieva, N.S. Kudryasheva // Journal of Molecular Structure. – 2009. – V. 924-926. – P.148-152.

6. Belogurova, N.V. Spectral components of bioluminescence of aequorin and obelin / N.V. Belogurova, N.S.Kudryasheva, R.R. Alieva, A.G. Sizykh // Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology. – 2008. – V. 92. – P. 117-122.

Помимо вышеуказанных публикаций, автором опубликовано 12 тезисов в материалах российских и международных конференций, из них 3 тезисов в реферируемом журнале Luminescence по материалам XVII-ого и XVIII-ого Международных симпозиумов по биолюминесценции и хемилюминесценции.

Публикации основных научных результатов диссертации соответствуют требованиям пунктов 11 и 13 «Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года.

Диссертация Алиевой Р.Р. отвечает требованиям пункта 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года. Диссертация не содержит заимствованных материалов и результатов без ссылок на авторов и источники заимствования. В диссертации даны ссылки на результаты работ, выполненных Р. Р. Алиевой в соавторстве с Н. В. Белогуровой, А. С. Петровой, Ф. Н. Томилиным, А. А. Кузубовым, С. Г. Овчинниковым, Л. С. Тирранен, А. Г. Сизых.

На основании вышеизложенного комиссия рекомендует Диссертационному совету Д 002.039.01 принять к защите диссертационную работу Алиевой Розы Ришатовны «Влияние внешних физико-химических факторов на спектрально-люминесцентные свойства разряженного фотопротейна обелина» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - биофизика.

Комиссия рекомендует утвердить в качестве официальных оппонентов:

доктора биологических наук, **Исмаилова Анвара Джураевича**, ведущего научного сотрудника кафедры микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»,

доктора биологических наук, **Векшина Николая Лазаревича**, ведущего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биофизики клетки Российской академии наук» (ИБК РАН).

В качестве **ведущей организации** предлагается Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «**Национальный исследовательский Томский государственный университет**».

Председатель комиссии:
д.х.н.

Члены комиссии:

д.ф.м.н., профессор

д.б.н.



Трофимов А.В.

Тихонов А.Н.

Дудник Л.Б.