

Отзыв

официального оппонента

на диссертационную работу Алиевой Розы Ришатовны «Влияние внешних физико-химических факторов на спектрально-люминесцентные свойства разряженного фотопротейна обелина», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

03.01.02 – биофизика

Актуальность темы

Флуоресцентные белки широко применяются для решения большого круга практических задач медицины и биологии. Они используются для имиджинга клеточных структур и визуализации физиологических процессов в клетках. В настоящее время известно достаточно много флуоресцентных белков (зеленый флуоресцентный белок – GFP и др.), характеризующихся различными флуоресцентными свойствами. Кроме GFP-подобных, к группе флуоресцентных белков относятся целентерамид-содержащие белки (разряженные фотопротейны), которые присутствуют в светящихся морских кишечнополостных (медузах *Aequorea* и *Phialidium (Clytia)*, гидроидном полипе *Obelia longissima* и др.). Автором диссертации рассматриваются люминесцентные свойства фотопротейна обелина, выделенного из гидроидного полипа *Obelia longissima*. В литературном обзоре представлено значительное количество ссылок на работы, связанные с применением обелина в качестве индикатора ионов внутриклеточного кальция и биолюминесцентной метки в различных аналитических системах. Однако, несмотря на преимущества фотолюминесценции фотопротейнов, разряженные фотопротейны, в отличие от GFP-подобных белков, не получили широкого распространения в биомедицинских исследованиях, и их потенциал в качестве флуоресцентных биомаркеров в настоящее время недооценен. Работа Р.Р.Алиевой направлена на расширение перспектив применения фотолюминесценции фотопротейнов на примере разряженного фотопротейна обелина. Актуальность темы данной работы не вызывает сомнений.

Научная новизна работы

В диссертационной работе Алиевой Р.Р. продемонстрировано, что спектры флуоресценции разряженных фотопротейнов (обелина, акворина, клитина) и их флуорофора (целентерамида) зависят от энергии возбуждения: при фотовозбуждении в высшие электронно-возбужденные состояния возникает дополнительное излучение в ближней ультрафиолетовой области.

Определена природа этого 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. Предположено, что ультрафиолетовое

излучение целентерамида может вносить вклад в ультрафиолетовую флуоресценцию разряженных фотопротеинов.

В работе впервые установлено, что такие физико-химические факторы, как повышенная температура, воздействие экзогенных соединений, процесс лиофилизации препарата изменяют характеристики фотолюминесценции разряженного обелина в видимой области спектра.

Практическая значимость

Выявленная переменность спектров флуоресценции разряженного обелина является основой для разработки новых цветовых биомедицинских маркеров. Интенсивность флуоресценции разряженного обелина и соотношение вкладов фиолетовой и сине-зеленой компонент флуоресценции автор предлагает 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. Возможность регистрации фотолюминесценции в качестве физиологической функции придает данной биотестовой системе максимальное удобство при практическом использовании. Результаты исследований могут расширить многофункциональность препарата обелина и повысить эффективность его использования в различных биомедицинских анализах.

Общая характеристика и содержание работы

Диссертационная работа Алиевой Р.Р. построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов (глава 2), изложения собственных исследований автора (главы 3-4), заключений по главам 3 и 4, выводов, списка цитированной литературы, приложений (А-Е). Работа изложена на 120 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 39 рисунками и содержит 3 таблицы, не включая приложения. Библиография включает 144 источников.

Во введении обоснована актуальность темы, четко сформулированы цель и задачи исследования, охарактеризована научная новизна и практическая значимость полученных результатов. Автор формирует в качестве цели диссертационной работы выявление закономерностей варьирования спектров флуоресценции разряженного фотопротеина обелина при изменении энергии фотовозбуждения и воздействии ряда деструктивных физико-химических факторов – экзогенных соединений, повышенной температуры, процесса лиофилизации.

Для достижения указанной цели поставлены следующие задачи: 1) продемонстрировать зависимость флуоресцентных характеристик разряженных фотопротеинов от энергии фотовозбуждения; 2) провести экспериментальный и теоретический анализ флуоресцентных свойств флуорофора разряженных фотопротеинов – молекулы ЦЛМ, при различных энергиях фотовозбуждения; 3) выявить зависимости спектральных характеристик флуоресценции

разряженного обелина (интенсивности и вклада спектральных компонент) от концентрации экзогенных соединений – этанола, этиленгликоля, глицерина, ДМСО; 4) определить зависимости спектральных характеристик флуоресценции разряженного обелина (интенсивности и вклада спектральных компонент) от времени хронического воздействия повышенной температуры (40 °С); 5) связать вариабельность спектров флуоресценции разряженного обелина под действием деструктивных физико-химических факторов (экзогенных соединений, температуры, процесса лиофилизации) с изменением эффективности переноса протона в возбужденном состоянии флуорофора.

Все поставленные цели и задачи успешно выполнены и сформулированы в виде положений, выносимых на защиту.

Литературный обзор (глава 1) содержит современные данные о флуоресцентных белках и их флуорофорах; описаны механизмы образования эмиттеров люминесценции фотопротеинов. В целом, обзор литературы написан хорошим научным языком, приведённые автором материалы дают достаточно полное представление относительно проблематики исследования в области люминесценции фотопротеинов.

В следующей главе 2 представлены материалы и методы, применяемые автором данной работы. Из данного раздела диссертации следует, что работа выполнена на современном методическом уровне и на надежном аналитическом оборудовании. Комплексное использование нескольких физико-химических методов таких как флуориметрический, спектрофотометрический, биохимический и квантово-химический обеспечивают надежность и достоверность полученных в работе данных.

В *третьей главе* спектрально-люминесцентные свойства целентерамида проанализированы с использованием экспериментального и теоретического подходов. Представлено подробное обсуждение полученных результатов и их сравнение с современными научными данными зарубежных авторов.

В *четвертой главе* проведено исследование воздействий на флуоресценцию разряженного обелина ряда физико-химических факторов – экзогенных веществ (этанола, этиленгликоля, глицерина и ДМСО) и повышенной температуры. Данное исследование вносит вклад в понимание механизмов воздействия внешних факторов (включая факторы химической токсичности и температурное воздействие) на белковые комплексы и может быть использовано при разработке основ использования флуоресцентных белков в качестве биосенсоров для оценки степени токсического воздействия.

По материалам диссертации опубликовано 6 статей в журналах ВАК, 12 тезисов докладов на российских и международных конференциях, что соответствует уровню требований, предъявляемых к кандидатским диссертациям.

Приведенный в автореферате перечень статей, тезисов, также как участие в отечественных и зарубежных конференциях, свидетельствуют о высоком уровне научной работы диссертанта. Текст диссертации и автореферата

изложен хорошим литературным языком, иллюстрации аккуратно оформлены. Представленные в автореферате сведения достоверны, выводы и рекомендации научно обоснованы. Автореферат полностью раскрывает основные положения диссертации и соответствует ее содержанию.

Замечания к работе

В качестве замечаний к данной работе можно сказать следующее:

В работе рассчитан квантовый выход свободного целентерамида в метаноле при варьировании энергии фотовозбуждения. Возникает вопрос, почему не рассчитан квантовый выход флуоресценции разряженного обелина? Было бы интересно сравнение и обсуждение этих данных.

Указанный недостаток не является принципиальным и ни в коей мере не снижает высокую оценку диссертационной работы.

Заключение

Считаю, что диссертация Алиевой Розы Ришатовны «Влияние внешних физико-химических факторов на спектрально-люминесцентные свойства разряженного фотопротейна обелина» является законченным научно-квалификационным исследованием. Данная диссертационная работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями постановления Правительства РФ от 24.04.2016 №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сам диссертант, Алиева Р.Р., несомненно заслуживает присвоения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Официальный оппонент
ведущий научный сотрудник кафедры
микробиологии биологического факультета ФГБОУ ВО
Московского государственного университета
имени М. В. Ломоносова,
доктор биологических наук



Исмаилов Анвар
Джураевич

Адрес: РФ, 119234, Москва, Ленинские горы,
д. 1, стр. 12, биологический факультет, МГУ
тел. 8(495)939-34-50, e-mail: anvaris@list.ru

Подпись в.н.с., д.б.н. Исмаилова Анвара Джураевича заверяю
декан биологического факультета

МГУ имени М.В.Ломоносова, академик РАН М.П.Кирпичников

