

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Алиевой Розы Ришатовны «Влияние внешних физико-химических факторов на
спектрально-люминесцентные свойства разряженного фотопротеина обелина»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.02 – биофизика

Диссертационная работа Алиевой Р.Р. посвящена изучению флуоресцентных свойств целентерамид-содержащих флуоресцентных белков на примере обелина из гидроидного полипа *Obelia longissima* под действием различных физико-химических факторов (температуры, экзогенных веществ). Фотопротеин обелин – уникальный, нетоксичный белок, который является селективным по отношению к ионам кальция и флуоресцирует в ходе биолюминесцентной реакции. В литературном обзоре представлено достаточное количество ссылок на работы, связанные с применением биолюминесценции обелина и его аналогов в качестве индикатора ионов внутриклеточного кальция и биолюминесцентной метки в различных аналитических системах. Вместе с тем, продукт биолюминесцентной реакции (разряженный обелин), являясь комплексом полипептида и целентерамида, способен к эффективной флуоресценции под действием возбуждающего света. Однако его флуоресцентные свойства не получили широкого распространения в биомедицинских исследованиях, и его потенциал в качестве флуоресцентного биомаркера недооценен. Данная работа направлена на расширение перспектив применения препарата обелина, а именно, использование этого белка в качестве фотолюминесцентного биомаркера. Использование разряженного обелина для мониторинга токсичности способно придать препарату обелина многофункциональность и повысить эффективность его применения. Актуальность темы данной работы не вызывает сомнений.

Диссертация объемом 120 страниц состоит из введения, четырех содержательных глав, заключений по третьей и четвертой главам, отдельно

сформулированных выводов, списка цитированной литературы из 144 наименований, а также приложений.

Во введении обоснована актуальность темы, четко сформулированы цель и задачи исследования, охарактеризована научная новизна и практическая значимость полученных результатов. Все поставленные цели и задачи успешно реализованы и сформулированы в виде положений, выносимых на защиту. Полученные результаты являются принципиально новыми и дают основу для разработки новых цветных биомедицинских флуоресцентных маркеров на основе разряженного обелина.

В диссертационной работе Алиевой Р.Р. продемонстрировано, что спектры флуоресценции разряженных фотопротеинов (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. С помощью квантово-химических расчетов определена природа этого ультрафиолетового излучения. Описаны электронные переходы, вовлеченные в этот процесс. Предполагается, что ультрафиолетовое излучение целентерамида может вносить вклад в ультрафиолетовую флуоресценцию разряженных фотопротеинов.

В работе также впервые продемонстрировано, что такие физико-химические воздействия, как повышение температуры, влияние экзогенных соединений (этанола, этиленгликоля, глицерина и ДМСО), процесс лиофилизации препарата – изменяют характеристики фотолюминесценции разряженного обелина в видимой области спектра. Интенсивность флуоресценции разряженного обелина и соотношение вкладов фиолетовой и сине-зеленой компонент его флуоресценции автор предлагает использовать в качестве количественных оценок степени деструкции разряженного обелина и, следовательно, для оценки токсических эффектов. Следует подчеркнуть, что использование соотношения спектральных компонент (фиолетовой и сине-зеленой) в качестве биотестового параметра может являться основой для

создания нового типа биосенсора – на основе мониторинга эффективности элементарных физико-химических процессов в белковом комплексе, точнее, переноса протона в электронно-возбужденном состоянии флуорофора белка. Такой подход может оказаться плодотворным, т.к. в настоящее время в токсикологии имеется потребность в оценке токсических эффектов с точки зрения элементарных физико-химических процессов с использованием простейших биологических систем и удобных методов регистрации токсичности. Этим условиям и удовлетворяют: (1) использование простейшей биологической системы, т.е. флуоресцентного белка, (2) его фотохимическая активность и (3) возможность флуоресцентной регистрации показателей токсичности.

Автор достаточно корректно использует известные научные физико-химические методы для обоснования полученных результатов и выводов. Полученные результаты сопоставлены с современными научными данными зарубежных авторов. Результаты и выводы работы обоснованы и достоверны, они опираются на существующую теоретико-методологическую базу.

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.

Автореферат полностью раскрывает основные положения диссертации и соответствует ее содержанию.

Замечания к работе

Излучение из высших состояний хорошо известно для атомов и простых молекул в газовой фазе. Для многоатомных молекул в жидкой фазе такие флуоресцентные переходы из высших состояний чрезвычайно маловероятны. Экспериментальных спектроскопических работ в конденсированной фазе для гетероциклических молекул на эту тему почти нет. Зависимость спектров излучения от длины волны возбуждения это тоже редкий случай, особая тема. Наличие эксиплексов и фотоконформеров может приводить к возникновению

двух полос излучения даже при наличии одного центра поглощения. Нужно подчеркнуть, что образование эксиплексов и фотоконформеров, включая протонированные формы и КПЗ, происходит обычно гораздо медленней, чем электронно-колебательные переходы. К сожалению, в литобзоре диссертации и в экспериментальной части этим вопросам не уделено достаточного внимания. Из диссертации не всегда видно, какие именно физические причины в каждом конкретном случае приводят к возникновению излучения из высших состояний, к резкому увеличению вероятности подобных процессов.

Указанные замечания относятся к области оптической спектроскопии, т.е. не являются принципиальными в биологии и ни в коей мере не снижают высокую оценку диссертационной работы.

Считаю, что диссертация Алиевой Розы Ришатовны «Влияние внешних физико-химических факторов на спектрально-люминесцентные свойства разряженного фотопротеина обелина» является законченным научно-квалификационным исследованием. Данная диссертационная работа полностью соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (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»), а сам диссертант, Алиева Р.Р., несомненно заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Официальный оппонент,
ведущий научный сотрудник лаборатории
внутриклеточной сигнализации
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
«Институт биофизики клетки РАН»,
доктор биологических наук



Векшин Николай Лазаревич

Адрес: РФ, 142290, г. Пущино Московской
области, ул. Институтская, 3, ИБК РАН
тел. 8 (4967) 73-94-32, e-mail: nvekshin@rambler.ru

Подпись в.н.с., д.б.н. Векшина Н. Л. заверяю
Учёный секретарь ИБК РАН,
к.б.н.

15 декабря 2016 г.



Handwritten signature in blue ink.

Масулис И.С.