

«Утверждаю»

Проректор по ИР ОГУ
проф. В.И. Жаданов

31 октября 2016 г.



Отзыв

ведущей организации

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
на диссертацию Кулешовой Анны Александровны

«ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
НАНОМАРКЕРОВ СЕМЕЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕИНА
В РАСТВОРАХ СЫВОРОТОЧНЫХ АЛЬБУМИНОВ»

представленную на соискание

ученой степени кандидата физико-математических наук
по специальностям 01.04.05 – оптика и 03.01.02 – биофизика

Развитие спектрально-люминесцентных методов регистрации изменений конформационных состояний и функциональной активности биологических макромолекул является важным направлением современной молекулярной биофизики, сопряженным с оптосенсорикой и созданием новых систем люминесцентного медицинского мониторинга. Нативные белковые структуры представляют собой специфические молекулярные наносистемы с селективным откликом на действие различных возмущающих факторов: тепловых, электромагнитных, химических и биологических. Молекулярные люминесцентные метки, в качестве которых часто используют биологически совместимые молекулы органических красителей ксантенового ряда, являются удобными индикаторами состояний протеиновых систем, слабо возмущающими изучаемый объект, как в спектральном, так и в биологическом плане.

Диссертационная работа Кулешовой А.А. посвящена исследованию спектрально-флуоресцентных, спектрально-поляризационных и абсорбционных характеристик люминесцентных молекулярных зондов (наномаркеров – по терминологии автора), сформированных на основе красителей флуоресцеинового ряда (флуоресцеин и его галогензамещенные аналоги) в растворах альбумина с различными значениями рН, и определению набора и значений параметров, характеризующих состояния маркеров, адресно

связанных с белками альбуминового семейства. В силу принадлежности одному гомологическому семейству сывороточные белки (человеческий и бычий) имеют схожую структуру, с близкими числами аминокислотных остатков: 585 и 582. При соответствующих рН вторичные структуры этих белков содержат приблизительно одинаковое количество регулярных субструктур.

Большое значение в изучении функциональных и структурных характеристик связывающих центров белков приобрел метод флуоресцентных молекулярных зондов, обладающий высокой чувствительностью к малым структурным и зарядовым изменениям окружающей белковую цепь среды. Развитие спектральных методов диагностирования с целью повышение их информативности осуществляется перманентно, в том числе – за счет синтеза новых органических красителей, расширения гомологического ряда схожих по свойствам соединений, используемых в качестве люминесцентных меток. Предсказуемое изменение параметров зонда при переходе к очередному члену ряда дает уникальные возможности идентификации конформационных изменений, претерпеваемых белковой структурой. Кроме того, активация радиационного канала в спектральной полосе фосфоресценции молекулярных меток способствует решению ряда задач, практически неразрешимых в рамках чисто флуоресцентного спектрального анализа.

Таким образом, актуальность диссертационной работы Кулешовой А.А. является безусловной, ввиду исключительной важности информации о конформационных перестройках в белках для молекулярной биологии, биофизики и других, смежных с ними разделов науки и технологических приложений.

В диссертации были поставлены и успешно решены следующие задачи. Проведены систематические измерения спектрально- флуоресцентных характеристик молекулярных маркеров в растворах сывороточных альбуминов при различных концентрациях белков и зондов в широком диапазоне значений рН растворов. Подробно проанализирован характер изменений параметров люминесцентных сигналов и связанных с ними перестроек структуры белковых систем. Так, например, диссертантом определены константы связывания люминесцентных зондов с белками и коэффициенты кооперативности этого процесса. Проведен анализ процессов ассоциации молекул красителей, применяемых в качестве люминесцентных меток. Определена структура ассоциатов, а также степень влияния белков на процессы агрегации и образования комплексов с протеинами. Систематические измерения спектров поляризованной флуоресценции молекулярных маркеров позволили определить параметры ориентационной подвижности (коэффициенты вращательной диффузии) зондов в растворах сывороточных альбуминов при различных значениях рН белковых растворов.

Реализованный в диссертации спектральный метод измерения люминесцентных сигналов, характеристик поглощения и степени поляризации излучения белковых растворов позволил корректно осуществить процедуру идентификации конформационных перестроек исследованных протеиновых наносистем, учитывающую специфику строения структурных единиц, входящих в их состав, а также особенности межмолекулярного взаимодействия. Перечень областей современной науки и техники, для которых получение новых результатов в данном направлении является чрезвычайно актуальным достаточно широк – это молекулярная биология и протеомика, оптическая спектроскопия супрамолекулярных комплексов и динамика полимерных субструктур, новые медицинские технологии, особенно в области гематологии.

В структурном отношении диссертация Кулешовой А.А. содержит вводную часть, основную часть из трех глав, а также перечня основных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Общий объем работы составляет 121 страницу, включающих 62 рисунка и одну таблицу, а также список из 133 цитируемых литературных источников.

Во Введении показана актуальность выбранного направления исследований, сформулированы цели и задачи, отражена научная новизна и практическая значимость работы, приведено краткое содержание ее по главам.

В Главе 1 обсуждаются известные спектроскопические исследования взаимодействий различных красителей, имеющих достаточно высокий квантовый выход флуоресценции, с биологическими объектами. В частности, отмечается, что использование таких красителей во флуоресцентной спектроскопии позволяет получать данные как *in vivo*, так и при работе с тканями биологического материала, в другом варианте – заменяющими его модельными системами.

Глава 2 посвящена изложению методики эксперимента. Произведено описание пробоподготовки растворов альбуминов (бычьего и человеческого) с молекулярными маркерами органических красителей семейства флуоресцеина. Подробно излагается процедура измерения спектров поглощения и определения степени молекулярной ассоциации, равно как и ряда конфигурационных параметров системы. Обсуждаются особенности измерения спектрально-люминесцентных характеристик окрашенных растворов и маркированных белков.

В Главе 3 представлены результаты исследования. Приведены спектральные характеристики флуоресценции растворов маркированных альбуминов, а также данные по тушению флуоресценции, включая и концентрационное тушение. Кроме того, здесь же приведены результаты исследования процессов молекулярной ассоциации маркеров флуоресцеинового ряда в белковых растворах. Завершается глава изложением результатов по

изучению процессов вращательной диффузии люминесцентных молекулярных меток в растворах сывороточных альбуминов.

Таким образом, экспериментальное исследование структурных и динамических свойств молекулярных люминесцентных зондов, ассоциированных со структурами различных сывороточных альбуминов в водных растворах различной кислотности, осуществленное в диссертационной работе Кулешовой А.А. является завершенной научной работой, автору которой удалось найти решение всех поставленных в диссертации задач. Использование спектрально-люминесцентных методов для изучения структуры белковых нанокластеров и молекулярной динамики флуоресцентных зондов в них для решения задач диссертационного исследования следует признать успешным, учитывая, что основными задачами в перечне очерченных диссертантом проблем являлись структурно-динамические задачи. Следует отметить, что столь детализированные свойства исследованных пробиологических наносистем не могли быть выявлены без привлечения современной спектроскопической методологии и соответствующего ей высокотехнологичного лабораторного инструментария.

Для интерпретации наблюдаемых зависимостей между оптическими спектрами и характерными параметрами белковых наносистем автором привлекались основные положения теории тушения люминесценции молекул в конденсированных средах, теории вращательной и концентрационной деполяризации люминесценции, а также новейшие достижения в области физики белков, молекулярной оптики и физики дисперсных систем.

Изложенные в диссертации результаты молекулярного конформационного анализа существенно дополняют имеющиеся литературные данные о структуре белковых кластеров и процессах образования молекулярных ассоциатов органических красителей в растворах сывороточных альбуминов. Обнаруженные автором диссертации особенности включения молекулярных зондов в белковые структуры водных растворов различной кислотности могут найти применение при разработке лекарственных препаратов в гематологии, новых методов люминесцентного мониторинга в молекулярной биологии и протеомике, а также в различных областях фармакологии и медицины. Автора диссертационной работы отличают оригинальность постановки ряда рассмотренных в диссертации экспериментальных задач, выбор адекватных и наиболее оптимальных спектрально-оптических методов измерений характерных параметров белковых наноструктур, а также использование взаимно дополняющих сочетаний абсорбционных и поляризационно-люминесцентных способов исследования строения надмолекулярных структур и динамики молекулярных зондов.

К недостаткам работы можно отнести использование несколько неоднозначного термина «наномаркер», не вызывающего нареканий в широком смысле, но приводящего к разночтениям, поскольку долгие годы, вплоть до настоящего времени, сам низкомолекулярный зонд не было при-

нято относить к нанообъектам, хотя таким объектом и является сама зондируемая система «маркер – белковый нанокластер». Насколько целесообразно употреблять его применительно к маркированию нанокластеров – вопрос выбора терминов, но традиции в их использовании («молекулярная метка», «молекулярный люминесцентный зонд») могли бы быть учтены автором при написании диссертации. Кроме того, остается без ответа вопрос о кинетике деполяризации люминесценции зонда, т.к. параметры вращательной диффузии молекулярных меток оцениваются на основе исключительно результатов спектрально-поляризационных измерений, проводимых со стационарным источником оптического возбуждения. Большой интерес представляли бы прямые измерения кинетики деполяризации свечения зондов в реальном времени. Вместе с тем, эти замечания ни в малейшей степени не снижают заслуг соискателя в получении важных и интересных результатов исследования, равно как их высокой оценки и труда диссертанта в целом.

В диссертационной работе Кулешовой А.А. обнаружены новые физические эффекты, предложены новые экспериментальные подходы к решению некоторых фундаментальных и прикладных проблем оптического мониторинга жизненно важных белковых структур, образования нанокластеров различного состава в электролитах, и физики дисперсных систем в целом. Представленная к защите работа отвечает необходимым требованиям ВАК России в отношении актуальности, научной новизны и практической значимости полученных в ней результатов.

Результаты исследований автора диссертации могут быть использованы в таких научных и образовательных учреждениях России как: Институт общей физики РАН, Физический институт им. П.Н.Лебедева РАН, Институт физики твердого тела РАН, Институт химической физики РАН, Институт биохимической физики РАН, Институт физики микроструктур РАН, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Санкт-Петербургский государственный университет, Саратовский государственный университет, Оренбургский государственный университет, а также в других вузах и научных центрах страны.

Приведенные в диссертационной работе результаты и выводы не противоречат современным концепциям, установившимся, в настоящее время, в физической химии полимерных растворов и белков, физике и химии дисперсных систем и конденсированных сред, биофизике белков и молекулярной биологии, а также и других разделах науки, имеющих прямое отношение к теме диссертации. Достоверность результатов подтверждается этой непротиворечивостью – с одной стороны, и использованием современных экспериментальных методов исследования и высокотехнологичных способов обработки результатов измерений – с другой.

Диссертация Кулешовой Анны Александровны рассматривалась на общем научном семинаре кафедры радиофизики и электроники и Центра

лазерной и информационной биофизики Оренбургского государственного университета и получила одобрение ведущих специалистов научных учреждений г. Оренбурга.

На основании вышеизложенного можно заключить, что диссертация Кулешовой Анны Александровны отвечает всем требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней и присвоения ученых званий» на соискание ученой степени кандидата наук, а диссертант заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальностям по специальностям 01.04.05 – оптика и 03.01.02 – биофизика, а Оренбургский государственный университет, как ведущая организация, назначенная Диссертационным советом Д 501.001.67 при МГУ им. М.В. Ломоносова, дает в этом соискателю Кулешовой А.А. соответствующую рекомендацию.

Директор Центра лазерной и информационной биофизики ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет»,
доктор физ.-мат. наук, профессор

М.Г. Кучеренко

Адрес: 460018, г. Оренбург, пр. Победы, 13, ОГУ, кор. 16, ауд. 16517.

Раб. телефон : (3532) 37-24-57.

E-mail: rphys@mail.osu.ru

Дата

31 октября 2016

Печать

Подпись М.Г. Кучеренко заверяю

