ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу 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.

Сывороточные альбумины человека (САЧ) и быка (БСА) входят в состав плазмы крови и выполняют важную функцию, связанную с транспортом метаболитов, переносимых кровью. Молекулы сывороточных белков САЧ и БСА имеют похожую молекулярную структуру и состоят из большого числа аминокислотных остатков, реагирующих на кислотность окружающей среды и на присутствие различного рода молекулярных соединений в плазме крови. Важной проблемой молекулярной биофизики является установление молекулярной структуры сывороточных белков и характера их взаимодействия с окружающей средой. Для получения информации о взаимодействии белков с окружающими их молекулами может быть использован метод флуоресцентных меток - флуоресцентных наномаркеров (зондов), очень чувствительных к присутствию вблизи молекул белков посторонних молекул. В качестве такого рода зондов в молекулярной биофизике используют молекулы различных типов красителей. В диссертационной работе Кулешовой Анны Александровны исследовались характеристики спектров фотолюминесценции и поглощения наномаркеров семейства флуоресцеина в буферных растворах и в водных растворах САЧ и БСА. Была поставлена задача экспериментального исследования вида спектров фотолюминесценции, спектрально-поляризационных характеристик и абсорбционных свойств сывороточных белков и наномаркеров в зависимости от pH окружающей среды и типа флуоресцентного маркера. Решались конкретные задачи установления

спектрально-флуоресцентных характеристик наномаркеров семейства флуоресцеина (флуоресцеин (Ф), эозин (Э), эритрозин (Эр) и бенгальский розовый (БР)) в водных растворах белков САЧ или БСА при варьировании значения pH и нахождения констант связывания этих наномаркеров белком. Решение таких задач является весьма актуальным, так как на основе данных о флуоресцентных маркерах, мгновенно реагирующих на изменения в окружающей среде, устанавливаются закономерности взаимодействия белка с лигандом или с лекарственным препаратом, представляющие интерес для приложений.

Таким образом, задачи, решаемые в диссертационной работе Кулешовой Анны Александровны, представляются весьма важными как для развития теории взаимодействия молекул белков с активными молекулярными соединениями, так и с практической точки зрения, для развития метода флуоресцентных наномеркеров с целью диагностики состояния биологических сред.

Экспериментальные исследования спектров поглощения и фотолюминесценции были проведены для буферных растворов, содержащих наномаркеры Ф, Э, Эр и БР, и для наномаркеров в водных растворах САЧ и БСА при различных концентрациях наномаркеров (10-150 мкм) и при различных значениях pH (3,5-8,0). Для оценки изменений pH под влиянием САЧ, БСА и наномаркеров были проделаны специальные эксперименты, в результате которых было показано, что это влияние крайне незначительно.

Измерения спектров поглощения наномеркеров, введённых в растворы САЧ и БСА, были проведены с использованием современной экспериментальной установки на основе спектрофотометра типа Perkin Elmer Lambda 35. Спектры поглощения наномаркеров регистрировались в диапазоне 300-700 нм с применением стандартных кварцевых кювет. Анализ наблюдаемых спектров поглощения осуществлялся с использованием апробированной цифровой программы UVWINLAB.

Для регистрации спектров фотолюминесценции использовался современный спектрофлуориметр Perkin Elmer LS 55. При этом возбуждение спектров фотолюминесценции осуществлялось монохроматическим излучением с различными длинами волн: 440, 520, 530 и 540 нм. Соответственно спектры флуоресценции регистрировались в диапазоне 450-700 нм. Анализ спектров флуоресценции проводился с использованием апробированной цифровой программы UVWINLAB.

Таким образом, экспериментальные результаты, представленные в диссертации, получены на современной спектральной аппаратуре. Их надёжность и достоверность не вызывает сомнений. Полученные экспериментальные результаты являются оригинальными и дополняют аналогичные исследования по спектроскопии наномаркеров в биологических структурах, опубликованные ранее.

Основные научные результаты диссертационной работы Кулешовой Анны Александровны состоят в следующем.

1. Обнаружено, что интенсивность фотолюминесценции красителей Ф, Э, Эр и БР в водных растворах САЧ и БСА уменьшается, по сравнению с соответствующей интенсивностью в буферных растворах. При этом установлено, что с увеличением pH тушение флуоресценции под действием белков для наномаркеров Э, Эр и БР в растворах, содержащих САЧ и БСА, уменьшается.

2. Показано, при введении наномаркеров Ф, Э, Эр и БР в водные растворы, САЧ и БСА, наблюдается длинноволновый сдвиг максимума спектра фотолюминесценции, по сравнению с аналогичными спектрами в буферных растворах.

3. На основе анализа спектров поглощения растворов, содержащих наномаркеры Ф, Э, Эр и БР, показано, что при достаточно большой концентрации наномаркеров формируются ассоциаты. При этом обнаружено,

что в водных растворах САЧ и БСА степень ассоциации наномаркеров уменьшается, по сравнению с соответствующими значениями в буферных растворах.

4. На основе анализа поляризационных характеристик спектров фотолюминесценции определены коэффициенты вращательной диффузии Ф, Э, Эр и БР и обнаружено их уменьшение в водных растворах САЧ и БСА в широком диапазоне pH (3,5-8,0), по сравнению с буферными растворами.

5. Показано, что спектральные характеристики наномаркеров Э, Эр и БР, введённых в водные растворы САЧ и БСА, имеют близкие значения, отличающиеся от соответствующих спектральных характеристик флуоресцеина.

Полученные экспериментальные результаты интерпретированы в рамках развитой к настоящему времени теории. Представленные выводы являются оригинальными, достоверными и хорошо обоснованными.

Остановимся на некоторых недостатках, присутствующих в данной работе.

1. В диссертации выполнена большая экспериментальная работа, но детали проведенных экспериментов отсутствуют. В частности, не приведены схемы экспериментальных установок, отсутствуют сведения о характеристиках возбуждающего излучения, о типах используемых поляризационных устройств и др. В результате воспроизведение результатов, полученных в данной диссертации, оказывается затруднительным.
2. В автореферате выводы об основных результатах в виде пунктов 3 и 7 об уменьшении коэффициентов вращательной диффузии в водных растворах САЧ и БСА, по сравнению с буферными растворами, практически совпадают.

Оценивая диссертацию Кулешовой А. А. в целом, следует отметить, что несмотря на приведённые недостатки, носящие технический характер, в данной работе получены важные научные результаты о спектрах фотолюминесценции и поглощения наномаркеров Ф, Э, Эр и БР, введённых в водные растворы САЧ и БСА. Полученные экспериментальные результаты о тушении и длинноволновом сдвиге спектров фотолюминесценции, зависящих от характеристик окружающей среды, открывают практические возможности для использования обсуждаемых наномаркеров при диагностике патологий и типов молекулярных структур, присутствующих в исследуемых биофизических объектах. Установленные условия образования ассоциатов наномаркеров позволяют найти диапазон концентраций наномаркеров, при котором их спектр соответствует мономолекулярным структурам красителей в растворе. Используемые в диссертации теоретические подходы для описания процессов тушения фотолюминесценции и длинноволнового сдвига в спектрах фотолюминесценции наномаркеров представляются важными для дальнейшего развития теории процессов взаимодействия белков с наномаркерами.

Таким образом, диссертационная работа Кулешовой А. А., выполненная на «стыке» оптики биофизики, представляет как общенаучный, так и практический интерес. Полученные в этой работе результаты опубликованы в ведущих научных изданиях, апробированы на научных конференциях и могут быть использованы широким кругом учёных и практиков, занимающихся оптическими исследованиями биофизических объектов. Текст автореферата достаточно точно отражает содержание диссертации.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Кулешовой А. А отвечает всем требованиям ВАК РФ и требованиям Положения о порядке присуждения учёных степеней в редакции Постановления №842 Правительства РФ от 24 сентября 2013 г.,

предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Кулешова А. А., заслуживает присуждения учёной степени кандидата физико-математических наук по специальностям 01.04.05 – оптика и 03.01.02 -биофизика

14.11.2016 г.

Заслуженный деятель науки Российской Федерации,
заведующий лабораторией комбинационного рассеяния света

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Физический институт имени П.Н. Лебедева» Российской академии наук,
доктор физико-математических наук, профессор

_____(В.С. Горелик)

119991 ГСП-1 Москва, Ленинский проспект, д.53, ФИАН.

Телефон: +7 (926)1180769

E-mail – gorelik@sci.lebedev.ru

Подпись В.С. Горелика заверяю.
Учёный секретарь ФИАН

_____ (А.В. Колобов)