

## ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу Ждановой Надежды Григорьевны «Связь фотофизических параметров тирозиновых остатков в сывороточных альбуминах с изменением структуры белка под влиянием лигандов и денатурации», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 – оптика**

Важными компонентами биологических структур являются белки, обеспечивающие основные процессы жизнедеятельности организмов. Объектами исследований работы Ждановой Надежды Григорьевны являются сывороточные альбумины: БСА (бычий сывороточный альбумин) и САЧ (сывороточный альбумин человека). Сывороточные альбумины выполняют в организмах транспортную роль в связи с наличием в их структуре участков, связывающих различные лиганды и активно взаимодействующих с различного рода молекулярными добавками, появляющимися в организме. В результате таких возмущений возможна денатурация белков и подавление их активности в процессах жизнедеятельности, что приводит к патологиям и изменениям в генетической системе организмов. В связи с этим важной задачей молекулярной биофизики является установление характера изменения структуры белков, в частности сывороточных альбуминов, под влиянием различного рода возмущений: изменения кислотности среды, присутствия тяжёлых металлов, лигандов и т.д. Для анализа конформационных переходов в структуре белка могут быть использованы методы спектрального анализа, в частности методы фотолюминесцентной спектроскопии. Для проведения такого анализа часто используют введение в структуру белка флуоресцентных меток, обеспечивающих возможность регистрировать спектры фотолюминесценции в видимом диапазоне при её возбуждении источниками излучения синей или зелёной областей спектра. Недостатком такого метода является введение дополнительных возмущений в молекулярную среду организма за счёт присутствия в ней чужеродных организму флуоресцентных меток.

Наличие в аминокислотных последовательностях белков ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана) позволяет анализировать структурные изменения в белках, используя ароматические аминокислоты как собственные флуоресцентные метки. Особенностью таких меток является необходимость для наблюдения их

люминесцентного излучения использования в качестве возбуждающего излучения источников ультрафиолетового диапазона, длина волны которых попадает в полосу поглощения соответствующего люминофора.

В диссертационной работе Ждановой Надежды Григорьевны ставится задача исследования зависимости характеристик спектров тирозиновой и триптофановой фотолюминесценции сывороточных альбуминов от возмущающих факторов в организме. При этом в качестве естественных флуоресцентных зондов используются ароматические аминокислоты, присутствующие в белковой цепи альбуминов. Такая постановка задачи является оригинальной. Решение такой задачи представляет общенаучный интерес для установления закономерностей взаимодействия белков с окружающей средой, а также практическое значение для диагностики патологий в организмах.

Для решения поставленной задачи в диссертации Ждановой Надежды Григорьевны были использованы современные экспериментальные установки. В качестве источников возбуждающего излучения были использованы: полупроводниковые светодиоды, генерирующие излучение с длиной волны 280 нм в импульсно-периодическом режиме с частотой повторения 10 МГц и длительностью импульсов 700 пс; четвёртая гармоника (266 нм) лазера на алюмоиттриевом гранате, генерирующего наносекундные импульсы с частотой 1кГц и энергией 2мкДж или с частотой 10 Гц при энергии в каждом импульсе 200 мкДж; светодиоды с длинами волн 407 и 513 нм и др. Для регистрации спектров фотолюминесценции использовались современные миниспектрометры, работающие в широком спектральном диапазоне, включая ультрафиолетовую область спектра, а также высокочувствительные фотоумножители с хорошим временным разрешением. Высокий уровень используемой аппаратуры свидетельствует о надёжности полученных экспериментальных результатов и возможности их обработки с использованием современных методов цифрового анализа наблюдаемых спектров и временных зависимостей сигналов фотолюминесценции.

Наиболее важные научные результаты диссертационной работы Ждановой Н. Г. состоят в следующем.

1. Установлены концентрационные зависимости спектров фотолюминесценции тирозиновых остатков САЧ при введении в водный раствор САЧ анионного детергента (SDS), моделирующего характер взаимодействия САЧ с жирными кислотами. Обнаружены изменения в

спектрах тирозиновой фотолюминесценции САЧ, обусловленные денатурацией альбумина за счёт его связывания с анионным детергентом при образовании мицеллоподобных агрегатов на скелете молекулы альбумина.

2. Построены концентрационные зависимости характеристик спектров фотолюминесценции тирозиновых остатков в САЧ при введении в водный раствор САЧ катионного детергента. При этом обнаружено возрастание интенсивности тирозиновой фотолюминесценции с ростом концентрации катионного детергента.

3. Установлены закономерности влияния на фотолюминесценцию альбумина тяжёлых металлов. Для решения такой задачи была использована лазерная установка, позволяющая облучать исследуемые растворы импульсами ультрафиолетового излучения с длиной волны 266 нм (четвёртая гармоника лазера YAG:Nd<sup>3+</sup>) с частотами следования: 10 Гц и 1 кГц. Было показано, что при частоте следования лазерных импульсов 1 кГц интенсивность флуоресценции уменьшается с течением времени. В качестве возможной причины такой закономерности предложено обеднение основного энергетического состояния за счёт увеличения скорости интеркомбинационной конверсии.

4. Обнаружен эффект денатурации альбумина под действием гидрохлорида гуанидина. При этом наблюдается тушение тирозиновой фотолюминесценции вследствие удаления функциональных групп, находящихся вблизи тирозиновых остатков. Важно отметить, что такие структурные изменения не удаётся обнаружить при анализе триптофановой флуоресценции.

5. Установлено влияние анионного детергента на тирозиновую флуоресценцию альбумина, присутствующего в плазме крови. Показано, что при этом в плазме крови формируются комплексы САЧ- SDS.

В целом полученные экспериментальные результаты являются оригинальными и научно обоснованными на основе использования современных представлений о структуре исследуемых белков и о процессах тушения и возгорания фотолюминесценции в соединениях, содержащих тирозиновые и триптофановые остатки. Надёжность представленных экспериментальных результатов обеспечивается современным уровнем используемой аппаратуры.

В то же время по представленной Ждановой Н.Г. диссертации целесообразно высказать следующие замечания.

1. Сведения об экспериментальных установках, используемых в диссертации для анализа спектров и временных зависимостей фотолюминесценции изложены в приложении. При этом не приведены схемы экспериментальных установок, отсутствуют конкретные данные о виде спектров используемых источников возбуждающего излучения, об их временных характеристиках и т.д. Известно, что полупроводниковые светодиоды ультрафиолетового диапазона имеют довольно широкий спектр (несколько нм) излучения; кроме того, в них возможно присутствие дополнительных полос, которые могут исказить наблюдаемый спектр люминесценции тирозина и триптофана.

2. Известно, что интенсивное ультрафиолетовое излучение может приводить к конформационным переходам, а также деструкции биологических структур. В связи с этим необходимо детально проследить характер изменения спектров фотолюминесценции белков под действием ультрафиолетового излучения в зависимости от времени облучения, интенсивности ультрафиолетового излучения и энергии возбуждающих импульсов. В диссертации применялись в качестве источников возбуждающего излучения лазерные импульсы длительностью в несколько наносекунд с частотой следования 1 КГц и энергией в каждом импульсе 2 мкДж. Соответственно импульсная мощность излучения составляла около 100 Вт. При жёсткой фокусировке такого излучения на образец интенсивность ультрафиолетового излучения в образце могла быть достаточно высокой для реализации необратимых структурных изменений в исследуемых белках. Учёт такого рода процессов в диссертации не проводился.

Оценивая диссертацию Ждановой Н.Г. в целом, следует отметить, что несмотря на приведённые недостатки, носящие технический характер, в данной работе получены важные научные результаты об оптических свойствах тирозиновых и триптофановых аминокислот в белке альбумина. В диссертации показано, что установление фотофизических параметров тирозиновых остатков существенно расширяет возможности флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии белков, по сравнению с традиционными методами, основанными на использовании флуоресцентных меток видимого диапазона, а также данных по фотолюминесценции триптофана, присутствующего в белках. Полученные Ждановой Н.Г. результаты представляют как научный, так и практический интерес для исследования конформационных изменений альбуминов в плазме крови и разработки оптических методов диагностики патологий.

Представленные в диссертации экспериментальные результаты согласуются с известными литературными данными, получены на современной аппаратуре с учётом возможных ошибок измерений и являются достаточно надёжными. По материалам диссертации были подготовлены статьи в ведущих научных журналах и доклады на многочисленных конференциях. Текст автореферата достаточно точно отражает содержание диссертации.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Ждановой Надежды Григорьевны «Связь фотофизических параметров тирозиновых остатков в сывороточных альбуминах с изменением структуры белка под влиянием лигандов и денатурации» 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, Жданова Надежда Григорьевна, заслуживает присуждения ей учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 – оптика.

15.09.2016 г.

Заслуженный деятель науки Российской Федерации,  
заведующий лабораторией ФИАН,  
доктор физико-математических наук, профессор

 (В.С. Горелик)


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

Телефон: 8 (926)1180769

E-mail – [gorelik@sci.lebedev.ru](mailto:gorelik@sci.lebedev.ru)

Подпись В.С. Горелика заверяю.  
Заместитель директора ФИАН



 (С.Ю. Савинов)