

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА ФТИ 34.01.03
на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе
Российской академии наук
по диссертации
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК
аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 12.10.2023 № 5
О присуждении Горбуновой Иоанне Алексеевне
ученой степени кандидата физико-математических наук

Диссертация «Исследование фотофизических свойств молекул NADH в растворах методами фемтосекундной поляризационной лазерной спектроскопии» по специальности 1.3.6 – «Оптика» принята к защите 29 июня 2023 г., протокол № 3, диссертационным советом ФТИ 34.01.03 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе Российской академии наук, расположенном по адресу: 194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул. д.26. Диссертационный совет утвержден приказом директора ФТИ им. А.Ф. Иоффе № 75, прил. 1 от 12 июля 2019 г., приказами Директора ФТИ им. А.Ф. Иоффе № 28 от 16.02.2023 г., № 41 от 25.02.2022 г., № 13 от 09.02.2021 г., № 177 от 11.10.2023 г. об изменении состава диссертационного совета ФТИ 34.01.03 и приказом Директора ФТИ им. А.Ф. Иоффе № 160 от 21.12.2021 г. о внесении изменений в шифры специальностей диссертационных советов.

Соискатель Горбунова Иоанна Алексеевна, 8 июля 1995 года рождения, в 2019 году с отличием окончила магистратуру Санкт-Петербургского национального исследовательского Академического университета РАН по специальности «Физика». В 2022 году она окончила аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе Российской академии наук по направлению 03.06.01 - «Физика и астрономия». Кандидатский экзамен по специальности 1.3.6 – «оптика» был успешно сдан соискателем в Физико-техническом институте им. А. Ф. Иоффе в 2022 г. В настоящее время соискатель работает в должности исполняющего обязанности младшего научного сотрудника в лаборатории оптики биомолекул и

кластеров Федерального бюджетного учреждения науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук.

Диссертация выполнена в лаборатории оптики биомолекул и кластеров Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук.

Научный руководитель – Васютинский Олег Святославович, доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией оптики биомолекул и кластеров Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

1. Иванов Вадим Константинович, доктор физико-математических наук, профессор кафедры физики Физико-механического института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», дал положительный отзыв на диссертацию, содержащий 4 замечания.

2. Анкудинов Александр Витальевич, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химических свойств полупроводников Федерального государственного учреждения науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук, дал положительный отзыв на диссертацию, содержащий 5 замечаний.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» (ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского») предоставила положительное заключение на диссертацию, содержащее 7 вопросов и замечаний. Заключение подготовлено и подписано доктором физико-математических наук, член-корреспондентом РАН, заслуженным деятелем науки, профессором Тучиным Валерием Викторовичем.

Отзыв утверждён проректором по научной работе и цифровому развитию ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» Короновским Алексеем Александровичем. В заключении указано, что содержание диссертации Горбуновой И.А. соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по специальности 1.3.6 – «оптика», а соискатель Горбунова И.А. заслуживает присуждения степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.6 – «оптика».

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что оба они имеют ученую степень доктора наук, работают в различных организациях, не имеют других ограничений, накладываемых п. 3.7 действующего Положения о присуждении ученых степеней. Выбранные оппоненты являются широко известными специалистами и обладают высоким уровнем компетентности в научной области, в которой выполнена диссертационная работа, что подтверждается их публикациями в рецензируемых научных журналах.

Выбор ведущей организации обосновывается тем, что Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» ведет активные исследования в области естественных наук. Проводится изучение физических явлений и процессов, которые могут быть использованы для создания новых приборов и методов экспериментальной физики, активно разрабатываются методы и приборы нанотехнологии и диагностики наноструктур. В состав института входят лаборатории масс-спектрометрии, оптики заряженных частиц и математического моделирования, автоматизации измерений и цифровой обработки сигналов, лаборатория систем детектирования частиц и излучений, тематика исследований которых близка к теме диссертации. Кроме того, в ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» действует диссертационный совет 24.2.392.06 по специальности 1.3.6. «Оптика».

Основное содержание диссертации представлено в 9 работах, из них в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, опубликовано 8 работ:

1. Сасин М.Э., Горбунова И.А., Безверхний Н.О., Бельтюков Я.М., Rubayo-Soneira J., Васютинский О.С., "Поляризованная флуоресценция молекул NADH при двухфотонном возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами с длиной волны 720-780 nm", Письма в журнал технической физики, 2019, 45(13), 37-39
2. Горбунова И.А., Сасин М.Э., Васютинский О.С. "Достижение субпикосекундного временного разрешения при исследовании процессов анизотропной релаксации биологических молекул", Письма в журнал технической физики, 2020, 46(4), 7-10
3. I. A. Gorbunova et al "Anisotropic relaxation in NADH excited states studied by polarization-modulation pump-probe transient spectroscopy". Phys. Chem. Chem. Phys. 2020, Vol. 22, pp. 18155-18168; Q1
4. I. A. Gorbunova et al "Two-Photon Excited Fluorescence Dynamics in NADH in water-methanol solutions: the Role of Conformation States", J. Phys. Chem. B, 2020, 124 (47) , 10682-10697;Q1
5. I.A. Gorbunova et al "Two-Photon Excited Fluorescence Dynamics in Enzyme-Bound NADH: the Heterogeneity of Fluorescence Decay Times and Anisotropic Relaxation", J. Phys. Chem. B, 2021, 125(34), 9692-9707;Q1
6. I.A. Gorbunova et al Determination of fluorescence quantum yields and decay times of NADH and FAD in water–alcohol mixtures: The analysis of radiative and nonradiative relaxation pathways, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 436 (1), 2023; Q1
7. I. A. Gorbunova et al "Two-photon excited polarized fluorescence in NADH in methanol/water solutions", Proc. SPIE 11076, Advances in Microscopic Imaging II, 1107621, (22 July 2019)

8. I. A. Gorbunova et al "Ultrafast polarization modulation transient spectroscopy to study electronic excited state dynamics in biological molecules", Proc. SPIE 11497, Ultrafast Nonlinear Imaging and Spectroscopy VIII, 1149713, (20 August 2020)
9. I. A. Gorbunova et al "The role of microenvironment in the mechanisms of fluorescence decay in free and protein-bound NADH", Proceedings Volume 11900, Optics in Health Care and Biomedical Optics XI; 119003G (2021)

На автореферат поступило 7 отзывов.

1. Отзыв доктора физико-математических наук, профессора РАН Хреновой Марии Григорьевны, профессора кафедры физической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», положительный, замечаний и вопросов не содержит.
2. Отзыв доктора химических наук, Кузьмина Владимира Александровича, заведующего лабораторией процессов фотосенсибилизации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, положительный, замечаний и вопросов не содержит.
3. Отзыв кандидата физико-математических наук, заведующего лабораторией оптической спектроскопии и микроскопии Щеславского Владислава Игоревича и кандидата биологических наук, заместителя директора по науке Ширмановой Марины Вадимовны НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ФГБОУ ВО ПИМУ Минздрава России, положительный, замечаний и вопросов не содержит.
4. Отзыв доктора физико-математических наук, Летуты Сергея Николаевича, профессора кафедры физики конденсированного состояния и биофизики ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», положительный, содержит 1 замечание:

- Цель работы сформулирована как «...проведение комплексных исследований динамики возбужденных состояний NADH...». Корректнее цель работы обозначить как установление закономерностей или особенностей релаксации возбужденных состояний молекул NADH, а проведение комплексных исследований рассматривать как способ достижения цели.
5. Отзыв доктора физико-математических наук, Лощёнова Виктора Борисовича, профессора, заведующего лабораторией лазерной биоспектроскопии Центра естественно-научных исследований Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН, положительный, замечаний и вопросов не содержит.
 6. Отзыв доктора физико-математических наук, Проскуракова Ивана Игоревича, ведущего научного сотрудника лаборатории молекулярной спектроскопии Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, положительный, содержит 2 замечания:
 - Полезно было бы привести данные о спектрах поглощения и флуоресценции НАД-Н. Спектр поглощения дал бы представление о возможностях селективного возбуждения НАД-Н в системах *in vivo*, а флуоресценции – о возможных проблемах регистрации на фоне, например, таких известных источников свечения, как триптофан белков. В автореферате не удалось найти данных о длинах волн флуоресценции НАД-Н ни в описании методов исследования, ни в подписях к рисункам.
 - В разделе 2.3, посвященном *ab initio* расчету различных конфигураций НАД-Н (с.12 автореферата), целесообразно было сообщить какое программное обеспечение использовалось.
 7. Отзыв кандидата физико-математических наук, Ширшина Евгения Александровича, старшего научного сотрудника кафедры квантовой электроники отделения радиофизики физического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, положительный, замечаний и вопросов не содержит.

Диссертационный совет отмечает, что в рамках выполненных соискателем работ по исследованию фотофизических свойств молекул NADH в растворах методами фемтосекундной поляризационной лазерной спектроскопии были получены следующие основные результаты:

1. Впервые показано, что наличие двух времен затухания флуоресценции NADH обусловлено различным распределением заряда в *cis*- и *trans*- конфигурациях никотинамида. Это различие влияет на скорость процессов безызлучательной релаксации в возбужденном состоянии NADH.
2. Разработан принципиально новый метод определения относительного количества сложенных и развернутых конформаций NADH, который основан на измерении времен вращательной диффузии NADH. Показано, что изменение конформационного состава NADH при изменении свойств растворителя обуславливает увеличение τ_r при концентрациях метанола в растворе более 60 %.
3. Впервые были разделены вклады наносекундных и пикосекундных каналов релаксации возбужденных состояний NADH.
4. Впервые показано, что единственное время затухания флуоресценции $\tau_4 \approx 4$ нс в комплексе NADH-ADH обусловлено низкой полярностью сайта связывания фермента и тем, что NADH находится в этом сайте в единственной *trans*-конфигурации.
5. Обнаружено существование анизотропного механизма релаксации в возбужденном состоянии комплекса NADH-ADH с временем $\tau_{vb} = 1$ нс, обусловленного поворотом дипольного момента перехода флуоресценции.
6. Разработан новый метод поляризационно-модуляционной спектроскопии накачка-зондирование, позволяющий исследовать динамику возбужденного состояния биологических молекул с субпикосекундным временным разрешением при возбуждении лазерными импульсами с энергией порядка 1 нДж. Метод апробирован для исследования динамики анизотропных процессов релаксации

в возбужденном состоянии молекул NADH в растворах различной вязкости и полярности.

Все научные результаты являются новыми и имеют фундаментальную и практическую значимость для развития методов неинвазивной диагностики живых клеток, основанных на наблюдении флуоресценции и поглощения молекул NADH. Результаты исследований могут быть использованы для получения детальной информации таких важных процессов с участием NADH, как стереохимия окислительно-восстановительных реакций, перенос протонов и электронов, генерация активных форм кислорода, фотоизомеризация, фотофрагментация и многих других. Кроме того, разработанный в рамках работы метод поляризационно-модуляционной спектроскопии накачка-зондирование имеет большую перспективу его применения для исследования нефлуоресцентных молекул в живых клетках и тканях. Практическая значимость работы заключается в том, что результаты работы могут быть использованы для разработки методов неинвазивной диагностики социально-значимых заболеваний и для разработки методов тестирования эффективности лекарственных препаратов на клеточном уровне.

Высокая степень достоверности результатов и обоснованность положений обеспечивается тем, что результаты работы воспроизводимы и повторяемы, а выводы, сделанные в работе, согласуются с современными представлениями в области исследований динамики возбужденных состояний биологических молекул. Кроме того, для получения экспериментальных результатов были использованы современные спектроскопические методы исследования, которые широко используются в мировом научном сообществе.

Полученные результаты позволили соискателю сформулировать и защитить следующие положения:

1. Существование двух времен затухания флуоресценции молекул NADH в растворах обусловлено различными скоростями безызлучательной релаксации в *cis*- и *trans*-конформациях никотинамида

- вследствие различных распределений зарядов в этих конформациях.
2. Существование единственного времени затухания флуоресценции молекул NADH, связанных с ферментом алкоголь-дегидрогеназа, обусловлено их нахождением в сайтах связывания только в *trans*-конформации. Увеличение времени затухания флуоресценции молекул NADH, связанных с алкоголь-дегидрогеназой, более чем на порядок по сравнению с временем затухания флуоресценции свободных молекул NADH, обусловлено снижением эффективности безызлучательных релаксационных процессов за счет значительного уменьшения полярности сайта связывания по сравнению с полярностью водного раствора.
 3. Квантовый выход флуоресценции NADH в водных растворах метанола, этанола и пропиленгликоля растет при увеличении вязкости и уменьшении полярности растворителя за счет снижения эффективности процессов безызлучательной релаксации. Квантовый выход содержит вклады от относительно медленных наносекундных и быстрых пикосекундных процессов релаксации.
 4. Затухание поляризации флуоресценции комплекса NADH-алкогольдегидрогеназа, экспериментально обнаруженное в наносекундном диапазоне, обусловлено анизотропной колебательной релаксацией в возбужденном состоянии NADH, приводящей в повороту дипольного момента перехода флуоресценции.
 5. Разработанный метод поляризационно-модуляционной спектроскопии накачка-зондирование позволяет детектировать безызлучательную релаксацию в многоатомных биологических молекулах с временным разрешением менее 0.3 пс при возбуждении фемтосекундными импульсами лазера с энергией в импульсе менее 1 нДж.
 6. Изменение во времени линейного дихроизма молекул NADH в водно-спиртовых растворах обусловлено поворотом дипольного

момента перехода молекул в процессе колебательной релаксации и вращательной диффузией.

Все представленные в диссертации результаты получены непосредственно автором или при его активном участии, что подробно указано в текстах диссертации и автореферата. Горбунова И.А. активно участвовала в формулировке задач, постановке эксперимента, получении экспериментальных результатов и проведении анализа полученных результатов. Анализ результатов выполнен совместно с соавторами опубликованных работ при непосредственном участии соискателя.

Основные результаты работы были доложены лично соискателем на 12 международных и всероссийских конференциях, в том числе наиболее важных: VI Съезд биофизиков России (16-21 сентября 2019 г., Сочи, Россия); Saratov Fall Meeting 2020, Conferences And Workshops Of VIII Symposium On Optics and Biophotonics (28 сентября – 3 октября 2020, Саратов, Россия); 7th International School and Conference "Saint-Petersburg OPEN 2020" on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures (27 апреля 2020, Санкт-Петербург, Россия); 6 th International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures, SPIE Optical Engineering + Applications (октябрь, 2020, online); XII International Conference on Chemistry for Young Scientists "MENDELEEV 2021" (сентябрь 2021, Санкт-Петербург, Россия); Четвертая международная конференция «Физика — наукам о жизни» (11-14 октября 2021, Санкт-Петербург, Россия); Современные проблемы фотобиологии (12–19 сентября 2021, Шепси, Россия); The International Conference Laser Optics (20-24 июня 2022, СанктПетербург, Россия); XXXIV Симпозиум «Современная химическая физика» (16-25 сентября, 2022, г. Туапсе, Россия), Международный симпозиум Saratov Fall Meeting 2022 (26-30 сентября, 2022, Саратов, Россия).

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 4 доктора наук по специальности 1.3.6 - «оптика», участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав

совета, проголосовали за – 17, против – 0, воздержавшихся – 1.

На заседании 12 октября 2023 года диссертационный совет принял решение присудить Горбуновой И.А. ученую степень кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.6 – «оптика».

Заместитель председателя

диссертационного совета

доктор физ.-мат. наук

Чернышев Федор Всеволодович

И.о. ученого секретаря

диссертационного совета

доктор физ.-мат. наук

Попов Алексей Юрьевич

12 октября 2023 г.