

**УТВЕРЖДАЮ**

Проректор по научной работе и цифровому  
развитию

ФГБОУ ВО «СГУ имени

Н. Г. Чернышевского»

д. ф.-м. н., профессор

Алексей Александрович Короновский

« 22 » сентября 2023 г.

## **ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» на диссертационную работу Горбуновой Иоанны Алексеевны «Исследование фотофизических свойств молекул NADH в растворах методами фемтосекундной поляризационной лазерной спектроскопии», представленную на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.4.5 – Оптика

Диссертация Горбуновой Иоанны Алексеевны посвящена исследованиям динамики возбужденного состояния кофермента восстановленного никотинамид-аденин-динуклеотида (NADH) в свободной форме и при связывании с ферментами в растворах. Для проведения исследований были использованы два принципиально различных метода время-разрешенной лазерной спектроскопии: метод наблюдения поляризованной флуоресценции в режиме счета фотонов при многофотонном возбуждении и метод поляризационно-модуляционной спектроскопии накачка-зондирование.

### **1. Актуальность темы исследований**

На сегодняшний день одним из приоритетных направлений биофизики, биомедицины и биотехнологий является разработка неинвазивных методов лазерной диагностики живых клеток, тканей и микроорганизмов. Наиболее распространенным методом является мониторинг флуоресценции естественных или искусственных биологических молекулярных зондов при их облучении лазерными импульсами. В частности, большой интерес представляют исследования естественного внутриклеточного кофермента NADH, который участвует в окислительно-восстановительных реакциях метаболизма живых клеток. Несмотря на то, что исследования NADH в растворах и живых клетках методами лазерной спектроскопии и микроскопии проводятся уже несколько десятилетий и их возможные важные практические применения были установлены, одной из актуальных нерешенных проблем является интерпретация получаемых фотофизических параметров и их связь с химико-биологическими процессами. Таким образом, возникает потребность в проведении комплексных фундаментальных исследований динамики возбужденного состояния NADH методами время-разрешенной поляризационной лазерной спектроскопии. Использование этих методов обусловлено их высокой спектральной и молекулярной специфичностью, а также возможностью диагностики быстрых фотоиндуцированных процессов в режиме реального времени.

### **2. Оценка структуры и содержания диссертации**

Диссертационная работа изложена на 168 страницах и состоит из введения, пяти глав, заключения, списка литературы из 170 наименований и трех приложений. Содержание автореферата полностью соответствует содержанию и основным положениям диссертации.

**Введение** диссертационной работы посвящено обоснованию актуальности данной проблемы.

**Первая глава** диссертационной работы представляет собой обзор литературы по методам время-разрешенной лазерной спектроскопии и их применению для исследования многоатомных биологических молекул. В обзоре рассмотрены процессы релаксации, происходящие в возбужденных состояниях многоатомных биологических молекул, приведены параметры, которые характеризуют эти процессы и могут быть получены непосредственно из эксперимента. Также обсуждаются теоретические и практические основы метода флуоресцентной время-разрешенной спектроскопии и метода спектроскопии накачка-зондирование. В обзоре также обсуждаются поляризационно-зависимые явления, возникающие при взаимодействии поляризованного лазерного излучения с многоатомными биологическими молекулами, а также обсуждаются методы исследования этих процессов. Кроме того, приводится обзор полученных ранее результатов исследования флуоресценции кофермента NADH методами время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии.

**Вторая глава** посвящена исследованию фотофизических свойств молекул NADH в растворах различной вязкости и полярности при двухфотонном возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами. В главе подробно описан метод наблюдения сигналов затухания ортогональных компонент поляризованной флуоресценции молекул NADH, представлена схема экспериментальной установки, а также подробно обсуждается процедура анализа полученных экспериментальных сигналов. В разделе 2.3 представлены результаты *ab initio* расчетов NADH. На основе результатов этих расчетов была разработана модель, объясняющая природу двух времен затухания флуоресценции NADH внутренними фотопроцессами, происходящими в никотинамиде (NA). В разделе 2.5 осуждаются результаты измерений анизотропии флуоресценции NADH и времени вращательной диффузии NADH. При этом, на основании экспериментальных значений анизотропии флуоресценции были определены компоненты тензора двухфотонного возбуждения  $S$  и проведен анализа симметрии перехода при двухфотонном возбуждении. В результате было обнаружено два канала двухфотонного возбуждения, для которых значения компонент тензора двухфотонного перехода значительно отличаются. Поведение времени вращательной диффузии  $\tau_r$  NADH было проанализировано в зависимости от вязкости раствора и распределения сложенных и развернутых конформаций NADH.

**В третьей главе** обсуждаются результаты измерений квантового выхода флуоресценции NADH в водных растворах этанола, метанола и пропиленгликоля. Для анализа экспериментальных результатов была разработана модель, которая позволила разделить быстрые (пикосекундные) и относительно медленные (наносекундные) каналы безызлучательной релаксации возбужденного состояния NADH. В результате использования этой модели было получено выражение для квантового выхода флуоресценции, в котором были разделены вклады квантовых выходов двух различных каналов релаксации, приводящих к уменьшению населенности возбужденного состояния NADH. В результате было показано, что увеличение квантового выхода флуоресценции NADH в растворах вода-метанол и вода-этанол с увеличением концентрации спиртов происходило за счет изменения скорости относительно медленных процессов наносекундной безызлучательной релаксации. При этом для растворов вода-пропиленгликоль было обнаружено снижение эффективности пикосекундного тушения

флуоресценции NADH при высоких концентрациях пропиленгликоля, что объясняется замедлением скорости быстрых внутримолекулярных процессов синглет-триплетной конверсии и неадиабатических электронных переходов в растворах высокой вязкости.

**В четвертой главе** приведены результаты исследования фотофизических свойств NADH при связывании с ферментом алкоголь-дегидрогеназа (ADH) в растворах. В работе сначала был проанализирован изотропный, независимый от поляризации, сигнал затухания флуоресценции  $I_{iso}(t)$ , в результате которого было выделено две группы времен затухания: два времени затухания  $\tau_1$  и  $\tau_4$ , которые ассоциировались с флуоресценцией комплекса NADH-ADH, и времена  $\tau_2$  и  $\tau_3$ , которые ассоциировались с флуоресценцией свободного NADH в растворе. Было установлено, что комплекс NADH-ADH характеризуется временем затухания флуоресценции  $\tau_4 = 4.5$  нс, что можно объяснить наличием единственной *trans*-конформации NADH в сайте связывания ADH. Для объяснения значительного увеличения этого времени, по сравнению со свободным NADH, были проведены *ab initio* расчеты электронной структуры NADH в условиях различной диэлектрической проницаемости. В результате было показано, что увеличение времени затухания флуоресценции комплекса NADH-ADH происходит за счет изменения разделение зарядов в никотинамиде в условиях аполярного сайта связывания ADH. Для анализа сигналов ортогональных поляризационных компонент флуоресценции комплекса NADH-ADH была разработана модель, в которой предполагается, что экспериментальный сигнал может быть представлен как сумма вкладов связанного с ферментом и свободного NADH. Наиболее важным результатом, полученным при анализе экспериментальных сигналов, является время деполяризации флуоресценции комплекса NADH-ADH  $\tau_{bv} = 0.89$  нс.

**В пятой главе** представлены результаты разработки метода поляризационно-модуляционной спектроскопии «накачка-зондирование». Обсуждаются результаты апробации этого метода для исследования процессов анизотропной релаксации возбужденного состояния NADH в растворах. В главе подробно обсуждается методика эксперимента и основные функциональные узлы экспериментальной установки. Применение этого метода впервые позволило зарегистрировать сигналы линейного дихроизма NADH. Для интерпретации наблюдавшихся экспериментальных сигналов была разработана модель, в рамках которой экспериментальный сигнал описывается выражениями, которые позволяют разделить вклады в сигнал процессов анизотропной колебательной релаксации в возбужденном состоянии молекул NADH и вращательной диффузии. Была исследована зависимость времени анизотропной колебательной релаксации  $\tau_v$  и времени вращательной диффузии  $\tau_r$  от концентрации этанола в растворе. Разработанный метод позволил исследовать быстрые релаксационные процессы в возбужденных состояниях многоатомных молекул. За счет использования балансной системы детектирования были эффективно подавлены высокочастотные шумы лазерного излучения и эффекты тепловой линзы, что привело к существенному (на порядки) увеличению соотношения сигнал/шум.

**В заключении** подведены итоги и сделаны основные выводы по результатам, полученным в ходе выполнения диссертационной работы.

### 3. Оценка новизны и достоверности научных результатов

#### Новизна

1. Впервые показано, что наличие двух экспериментально наблюдаемых времен затухания флуоресценции молекул NADH в растворах обусловлено различным распределением заряда в *cis*- и *trans*-конфигурациях никотинамида. При этом наблюдение единственного

времени затухания флуоресценции  $\tau \approx 4.5$  нс в комплексе NADH-алкоголь-дегидрогеназа обусловлено тем, что NADH находится в этом сайте в единственной *trans*-конфигурации.

2. Показано, что 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. На основе исследования квантового выхода и времен затухания флуоресценции NADH в водно-спиртовых растворах были разделены вклады наносекундных и пикосекундных каналов безызлучательной релаксации возбужденных состояний NADH.

4. Разработан и апробирован принципиально новый метод определения относительной концентрации сложенных и развернутых конформации NADH, основанный на измерении времен вращательной диффузии в водно-спиртовых растворах.

5. Впервые обнаружен процесс деполяризации флуоресценции комплекса NADH-ADH с временем  $\tau_{rh} = 1$  нс. Показано, что этот процесс обусловлен быстрой перестройкой конфигурации ядер в возбужденном состоянии NADH, сопровождающейся изменением направления дипольного момента перехода молекулы.

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.

Результаты диссертационной работы могут в дальнейшем быть использованы для исследований стереохимии окислительно-восстановительных реакций с участием NADH, генерации активных форм кислорода в процессе окислительно-восстановительных реакций, фотоизомеризации и фотофрагментации молекул NADH в живых клетках.

**Достоверность результатов**, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, определяется использованием современных спектроскопических методов исследования, которые в настоящее время широко-используются в мировом научном сообществе и активно развиваются. Все полученные результаты находятся в хорошем согласии с литературными данными и неоднократно докладывались на всероссийских и международных конференциях.

Результаты работы были опубликованы в 9 печатных изданиях, индексируемых в базе Web of Science и Scopus.

#### **4. Рекомендации для использования результатов и выводов диссертационной работы**

Результаты диссертационной работы могут быть полезны для разработки новых спектральных методов неинвазивной диагностики животных клеток, растительных клеток, а также бактерий и микроорганизмов без нарушения их жизненного цикла.

#### **5. Вопросы и замечания**

По диссертации имеются следующие вопросы и замечания:

1. На Рис. 4.5 на стр. 112 приведен график зависимости экспериментально полученных времен затухания флуоресценции NADH от диэлектрической проницаемости. На Рис. 4.5 видно, что

наблюдается монотонное увеличение обоих времен затухания флуоресценции при уменьшении диэлектрической проницаемости раствора, что согласуется с разработанной в рамках диссертационной работы моделью. Однако времена затухания флуоресценции NADH в растворе пропиленгликоля получились в два раза выше, чем в растворах метанола, хотя диэлектрическая проницаемость этих растворителей практически одинаковая. Чем обусловлено такое различие времен затухания NADH для этих растворов?

2. Начальная анизотропия флуоресценции  $\tau_0$  для комплекса NADH-ADH, полученная в диссертационной работе была меньше, чем начальная анизотропия для комплексов NADH-MDH и NADH-LADH, полученная в работах других исследователей. Чем обусловлено такое значительное отличие в начальной анизотропии флуоресценции при связывании NADH с алкоголь-дегидрогеназой по сравнению со связыванием с другими ферментами?

3. Разработанный в рамках диссертационной работы метод «накачка-зондирование» позволил зарегистрировать сигналы линейного дихроизма NADH. Возможно ли при анализе этих сигналов разделить поляризационно-зависимые процессы релаксации и процессы, связанные с уменьшением населенности возбужденного состояния?

4. Согласно схеме, представленной на Рис. 5.3, для отвода прошедшего через кювету зондирующего излучения в канал регистрации в методе «накачка-зондирование» используется делительная пластина. Как известно, наклонная диэлектрическая пластина по-разному отражает s и p компоненты поляризации падающего излучения. Не нарушает ли такая схема баланс компонент поляризации прошедшего через кювету зондирующего пучка?

5. На подписи к Рис. 2.2 отсутствует расшифровка обозначений некоторых функциональных узлов экспериментальной установки.

6. В подписи выражения 2.5 неправильно расшифрованы индексы  $\tau_i$

7. Как определены погрешности величины  $N_{\text{tot}}$ , представленные на Рис. 2.13.

Следует отметить, что вышеуказанные вопросы и замечания не носят принципиального характера и не затрагивают справедливость сделанных в работе выводов и не меняют общей положительной оценки диссертационной работы соискателя.

## 6. Заключение

Диссертационная работа Горбуновой Иоанны Алексеевны «Исследование фотофизических свойств молекул NADH в растворах методами фемтосекундной поляризационной лазерной спектроскопии» является законченным научным исследованием в данной тематике, выполненным на высоком научном уровне. Стоит отметить комплексность проведенных исследований, которые позволили получить принципиально важные результаты и сделать выводы, завершающие длительные дискуссии в области исследования кофермента NADH методами лазерной спектроскопии. А именно было предложено объяснение существования двух времен затухания флуоресценции NADH в растворах, а также существования только одного, но значительно более длинного времени затухания флуоресценции NADH, связанного с белками. До настоящего времени интерпретации этих времен сильно отличались у разных авторов. Также были детально изучены свойства и природа анизотропии флуоресценции и поглощения молекул NADH. Кроме того, в рамках настоящей работы был разработан новый перспективный метод фемтосекундной поляризационной лазерной спектроскопии «накачка-зондирование», который должен позволить в режиме реального времени отслеживать фотофизические и фотохимические процессы в многоатомных биологических молекулах в живых клетках и тканях.

На основании изложенного считаем, что диссертационная работа «Исследование фотофизических свойств молекул NADH в растворах методами фемтосекундной

поляризационной лазерной спектроскопии» отвечает всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.4.5 - Оптика согласно Положению о присуждении ученых степеней в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Физико-техническом институте им. А. Ф. Иоффе Российской академии наук, а ее автор Горбунова И.А. заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата физико-математических наук.

Диссертация обсуждена на расширенном заседании кафедры оптики и биофотоники ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского». Протокол № 12/23 от «22» сентября 2023 г.

Заведующий кафедрой оптики и биофотоники

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»,

доктор физико-математических наук по специальности 01.04.03 - Радиофизика,

член-корреспондент РАН,

заслуженный деятель науки РФ,

профессор

Валерий Викторович Тучин

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Почтовый адрес: 410012, Саратовская область, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

Телефон: +7(8452)261696

[www.sgu.ru](http://www.sgu.ru)

e-mail: [rector@sgu.ru](mailto:rector@sgu.ru)