

ОТЗЫВ

официального оппонента д. ф.-м. н., проф. ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» Иванова Вадима Константиновича

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) как в свободной, так и в связанной с ферментами в растворах формах. 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.

Актуальность темы диссертации

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 до сегодняшнего времени является определение и 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.

Основное содержание работы

Диссертационная работа Горбуновой И.А. состоит из введения, пяти глав, заключения, списка литературы из 170 наименований и трех приложений. Содержание работы изложено на 168 страницах, включая 50 рисунков и 16 таблиц.

Введение диссертационной работы посвящено обоснованию актуальности данной проблемы, формулируются задачи работы и приводятся основные положения, выносимые на защиту.

Первая глава диссертационной работы представляет собой обзор литературы по методам время-разрешенной лазерной спектроскопии и их применению для исследования многоатомных биологических молекул. В обзоре обсуждаются теоретические и практические основы метода поляризационной флуоресцентной время-разрешенной спектроскопии и метода спектроскопии накачка-зондирование. В обзоре также представлен раздел, посвященный исследованиям время-разрешенной флуоресценции кофермента NADH.

Во второй главе представлены результаты исследования фотофизических свойств молекул NADH в растворах различной вязкости и полярности при двухфотонном возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами. Наиболее важным результатом этого исследования является объяснение природы двух времен затухания флуоресценции NADH, а именно наличие *cis* и *trans* конформаций NADH обуславливает существование двух времен затухания флуоресценции. На основании результатов измерений анизотропии флуоресценции NADH 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.

В третьей главе представлены результаты измерений квантового выхода флуоресценции NADH в водных растворах этанола, метанола и пропиленгликоля. Наиболее значимым результатом данной главы является разделение быстрых (пикосекундных) и относительно медленных (наносекундных) каналов безызлучательной релаксации возбужденного состояния NADH на основе экспериментальных данных и разработанной модели. Впервые были разделены вклады квантовых выходов двух различных

каналов релаксации, приводящих к уменьшению населенности возбужденного состояния NADH.

Четвертая глава посвящена обсуждению результатов исследования фотофизических свойств NADH при связывании с ферментом алкоголь-дегидрогеназа (ADH) в растворах. В результате выполненной работы можно отметить следующие важные результаты: 1) 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; 2) было показано, что увеличение времени затухания флуоресценции комплекса NADH-ADH происходит за счет изменения разделения зарядов в никотинамиде в условиях аполярного сайта связывания ADH; 3) наблюдение времени деполяризации флуоресценции комплекса NADH-ADH $\tau_{bv} = 0.89$ нс.

В пятой главе представлены результаты разработки метода поляризационно-модуляционной спектроскопии накачка-зондирование. Разработанный метод был апробирован для исследования процессов анизотропной релаксации возбужденного состояния NADH в растворах. Важным результатом является то, что 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 отношения сигнал/шум.

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

Остановившись на работе в целом, следует отметить, автором, И.А. Горбуновой, проделана большая работа, получен целый ряд новых, практически важных результатов, часть которых представляет большой научный и методический интерес.

Научная новизна результатов исследования

К основным новым результатам и достижениям автора можно отнести следующие результаты.

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 $\tau_{bv} \sim 1$ 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 имеют практическое значение, поскольку 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.

Вопросы и замечания

По диссертации имеются следующие вопросы и замечания:

- 1) В главе 4 диссертационной работы, при анализе сигналов затухания флуоресценции NADH-ADH было показано, что использование 4х экспонент дает наилучший результат аппроксимации, по сравнению двух и трех экспоненциальной моделью. Однако известно, что при увеличении числа экспонент качество аппроксимации сигналов будет улучшаться. Кроме того, критерий согласия (хи квадрат) практически совпадает для трех и четырех экспоненциальной модели. Проводилась ли оценка достоверности введения четырех экспонент? В тексте диссертационной работы этот вопрос явно не рассмотрен.
- 2) При исследовании молекул NADH методом время-разрешенной флуоресценции в качестве растворителя был использован метанол, а при исследовании методом накачка-зондирование был использован этанол. Возникает вопрос, насколько будут ли сопоставимы результаты в случае растворов этанола и метанола? Из текста диссертации это не понятно.
- 3) В диссертационной работе представлены результаты исследования различных процессов безызлучательной релаксации в возбужденном состоянии NADH, проведена оценка влияния параметров растворителя и молекулярных конформаций на скорость этих процессов, однако ничего не сказано о характерных частотах, на которых эти безызлучательные переходы происходят.
- 4) В работе имеется ряд опечаток. Например, на стр.113 в таблице 7 неправильно указана единица времени, а в таблице 6 на стр. 104 не указаны погрешности.

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. В целом следует отметить, что автор проделал большой объем работы. Все результаты диссертации были опубликованы в 9 печатных изданиях и представлены на ряде международных конференций. Содержание автореферата полностью соответствует содержанию и основным положениям диссертации.

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 профессиональном уровне. Считаю, 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.

Официальный оппонент

профессор кафедры физики
ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский
политехнический университет Петра Великого»,
доктор физико-математических наук
по специальности 01.04.02 – «Теоретическая физика»

Иванов В. К.

25 сентября 2023 года

Почтовый адрес: 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29. СПбПУ
Телефон: 8 (800) 707-18-99, +7(911) 746-02-35
E-mail: office@spbstu.ru, ivanov@physics.spbstu.ru

Подпись Иванова В.К. удостоверяю: