

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **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».

Альбумин составляет наибольшую фракцию всех белков, которые содержатся в плазме крови. Альбумин осуществляет транспорт в организме множества гидрофобных соединений: жирных кислот, продуктов обмена веществ, лекарственных препаратов. Изменение внутримолекулярной структуры альбумина может приводить к нарушению функциональной активности белков, что может провоцировать развитие патологических состояний, с одной стороны, а с другой – служить их диагностическим признаком. Процессы связывания белков с различными лигандами и происходящими при этом их конформационными изменениями широко обсуждаются из-за важности во многих областях биотехнологических, фармацевтических и медицинских применений. С этих позиций разработка быстрой методики определения структурных изменений альбуминов весьма актуальна. Этой проблеме и посвящена диссертационная работа Н.Г. Ждановой, представляющая собой экспериментальное исследование, направленное на развитие новых методов диагностики конформационных изменений сывороточных альбуминов.

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения с выводами, приложения и библиографии. Работа изложена на 121 странице машинописного текста, включая 45 рисунков, 11 таблиц и список литературы из 126 наименований. Структура диссертации отличается от классической и аналогична рекомендованной структуре статей в высокорейтинговых междисциплинарных журналах, когда все «технологические подробности»

исследования выносятся в заключительный раздел работы после изложения и обсуждения основных результатов

Во **Введении** обоснована актуальность выбранной темы диссертационной работы, приводится описание состояния рассматриваемой проблемы, сформулированы цель и задачи исследований, основные положения, выносимые на защиту, новизна, научная и практическая значимость полученных результатов, представлен объем апробации результатов.

Глава 1 представляет обзор научной литературы по теме диссертации. В ней приводятся основные сведения о сывороточных альбуминах и приводятся примеры изменения структуры белков при патологических процессах в организме человека. Излагаются существующие представления о механизмах формирования и особенностях оптического отклика альбуминов, который определяется наличием ароматических аминокислотных остатков в их структуре, а также вводятся основные фотофизические параметры, используемые в работе. В заключительной части первой главы описаны оптические методы, используемые для характеристики структурных изменений белков, указываются их основные недостатки и ограничения. При этом всюду приводится английская транскрипция терминов. Изложение литературных сведений в первой главе проводится достаточно подробно и способствует восприятию оригинальных результатов, изложенных в последующих главах. В целом достаточно подробный и хорошо организованный литературный обзор логически обосновывает цель и задачи исследования.

Вторая глава работы посвящена разработке метода оптической регистрации конформационных изменений белка на модельной системе белок – анионный детергент. Особенностью такой системы является возможность моделирования конформационных перестроек молекулы белка как в случае связывания лиганда, близкого по свойствам к жирным кислотам,

(для малых концентраций детергента), так и полной денатурации белка (для его больших концентраций). Описанное в данной главе сравнительное исследование двух гомологичных белков хорошо иллюстрирует ограниченность стандартной методики определения изменения структуры, основанной на флуоресцентном отклике триптофановых остатков. Главным результатом данной части исследований является определение времени затухания флуоресценции тирозиновых остатков, выполненное впервые. На основании анализа зависимости от концентрации детергента указанного времени затухания флуоресценции, а также абсорбционных характеристик тирозиновых остатков показано, что снятие тушения флуоресценции данных флуорофоров определяется их локальной окрестностью, а не уменьшением эффективности переноса энергии по диполь-дипольному механизму. Полученные результаты подкреплены подробным анализом спектров поглощения системы, а именно, их четвертой производной, позволяющей сделать выводы об изменении параметров окружения тирозиновых остатков в альбуминах. Измеренный впервые в настоящем исследовании параметр — время затухания флуоресценции тирозиновых остатков в триптофан содержащих белках — может быть положен в основу нового метода диагностики конформационных изменений белков.

В третьей главе последовательно проверяются предположения о физических механизмах изменения фотофизических параметров тирозиновых остатков в белках. Для этого рассматриваются системы с различными лигандами и денатурантами. Как важный итоговый результат этой части исследований выявлены случаи, когда внешнее воздействие на белок проявляется в оптических характеристиках только тирозиновых остатков, что позволило автору конкретизировать области белка, структура которых меняется. Показано, что флуоресценция тирозиновых остатков чувствительна к изменению структуры альбуминов в субдомене IIIa и позволяет зарегистрировать изменения структуры белка, которые не влияют на флуоресценцию триптофановых остатков альбуминов. Тирозиновая

флуоресценция альбуминов является индикатором изменения его структуры в доменах I и III при связывании лигандов типа жирных кислот, а ее изменение связано с изменением локального окружения тирозиновых остатков. Установлено, что тирозиновая флуоресценция альбуминов является индикатором изменений первой гидратационной сферы альбумина, связанных с перераспределением водородных связей между поверхностными аминокислотами и молекулами растворителя. По сути, полученные в данной главе результаты позволяют обобщить разработанный в диссертации новый подход к анализу конформационных изменений альбумина и сделать заключение о его перспективности.

Четвёртая глава работы посвящена рассмотрению фотофизических параметров тирозиновых остатков альбуминов в плазме крови, в их нативном состоянии, при добавлении анионного детергента, близкого по своим свойствам к жирным кислотам. Основная сложность подобного исследования связана со сложнокомпонентным характером исследуемых образцов. Несмотря на это было показано, что изменение тирозиновой флуоресценции плазмы крови определяется взаимодействием лиганда с альбумином, а изменения, связанные с другими компонентами, несущественны. Данный факт позволяет говорить о том, что разработанная в диссертации методика может быть применена не только в модельной системе, но и в плазме крови, что определяет ее прикладную значимость.

.В **Заключении** диссертации приводятся выводы, обобщающие результаты проведенных исследований, в полном соответствии с заявленными целью и задачами работы.

В **Приложении** лаконично, но предельно информативно описаны основные спектрально-оптические методы, использованные в диссертации, и их экспериментальная реализация. Описаны также технологии приготовления образцов с полной идентификацией используемых ингредиентов, методов их контроля и используемой для этого

сертифицированной аппаратуры. Используемая в работе современная аппаратура гарантировала высокую точность и надежность проводимых измерений и, соответственно, получаемых результатов.

Защищаемые научные положения и выводы диссертации базируются на проведенном автором анализе научной литературы по свойствам и внутри молекулярной динамике сывороточных альбуминов и анализе механизмов формирования и особенностей оптического отклика альбуминов, определяемого наличием ароматических аминокислотных остатков в их структуре, а также на большом экспериментальном материале, полученном диссертантом самостоятельно в систематических исследованиях, выполненных на высоком научно-методическом уровне на современной спектрально-оптической аппаратуре.

Основные результаты диссертационной работы Н.Г. Ждановой опубликованы в реферируемых научных журналах, профильных сборниках научных трудов и неоднократно докладывались на российских и международных конференциях различного уровня, всего 13 публикаций.

Новизна полученных результатов подтверждается анализом работ других авторов по данной тематике, а также публикацией результатов диссертации в рецензируемых журналах.

Проведенный Н.Г. Ждановой цикл исследований научно обосновал возможность использования тирозиновой флуоресценции как количественного индикатора изменения конформации триптофан содержащих белков. Фактически предложен новый метод диагностики конформационных изменений белков. В практическом плане определение времени затухания тирозиновой флуоресценции в белке, содержащем триптофановые остатки, перспективно для создания нового метода медицинской диагностики, не зависящего от уровня концентрации белков в плазме крови.

Достоверность результатов диссертации определяется использованием Н.Г. Ждановой современной сертифицированной аппаратуры, проведением экспериментов на большом количестве образцов с многократным повторением, тщательной отработкой методики измерений, использованием современных методов обработки данных, а также сравнением с независимо полученными результатами других авторов. Успешная апробация результатов работы на научных форумах и в рецензируемых журналах не вызывает сомнения в их достоверности.

Автореферат адекватно отражает основное содержание диссертации. Содержание диссертации соответствует специальности 01.04.05 – Оптика.

Замечаний принципиального характера работа не имеет. Однако, несколько странной выглядит в автореферате в Списке использованной литературы ссылка [12] на собственную работу, изложенную в диссертации и представленную в Списке публикаций по теме диссертации [2].

Диссертационная работа Ждановой Надежды Григорьевны выполнена на высоком теоретическом, экспериментальном и методическом уровне и представляет собой самостоятельную законченную научную квалификационную работу в области спектрально-оптических методов исследования биологических макромолекул, содержащую оригинальные результаты, совокупность которых вносит заметный вклад в создание научно-методической базы оптических технологий в биомедицинских исследованиях.

Таким образом, по объёму выполненных исследований, актуальности, научно-практической значимости и новизне полученных результатов диссертационная работа «Связь фотофизических параметров тирозиновых остатков в сывороточных альбуминах с изменением структуры белка под влиянием лигандов и денатурации» полностью соответствует требованиям п. 9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного

постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (ред.от 30.07.2014), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Жданова Надежда Григорьевна – заслуживает присуждения искомой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05. – «оптика».

Официальный оппонент

ведущий научный сотрудник

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина»

Минздрава России

доктор физико-математических наук,

кандидат биологических наук

Иванов Андрей Валентинович

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр имени Н.Н.Блохина» Минздрава России (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» Минздрава России)

Адрес: 115478, Москва, Каширское ш., д.24 Тел./факс +7(499) 324 9294

E-mail: ivavi@yandex.ru

Подпись ведущего научного сотрудника доктора физико-математических наук Иванова А.В. заверяю.

Учёный секретарь

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина»

Минздрава России

кандидат медицинских наук



И.Ю.Кубасова