

Отзыв

официального оппонента о диссертационной работе Зюбина Андрея Юрьевича «Спектрально-кинетические исследования фотофизических процессов с участием молекул красителей и биомолекул в присутствии наночастиц серебра», представленной на соискание степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 — «оптика».

Диссертационная работа Зюбина Андрея Юрьевича посвящена экспериментальному изучению фотофизических процессов поглощения, флуоресценции, комбинационного рассеяния с участием НЧ серебра, биомолекул и красителей на поверхности твердого тела, в полимерных матрицах и в растворах.

В связи с развитием нанотехнологий создание и изучение различных наноструктурированных объектов и материалов с разнообразными свойствами привлекает большой интерес. На основе таких объектов разрабатываются новые технологии и устройства. Использование наночастиц металлов в новых технологиях объясняется особенностями их электронной структуры. Оптические свойства наночастиц представляют особый интерес для фундаментальных и прикладных исследований. В частности, использование плазмонного резонанса наночастиц, фиксированных на различных диэлектрических подложках или в матрицах, открывает возможности для создания материалов с новыми и весьма полезными оптическими свойствами. Такие структуры используются, например, в спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния. Этот метод в настоящее время активно применяется в медицинских исследованиях и имеет большие перспективы, т.к. дает возможность диагностики по исследованию образцов в малых количествах. Развитие комбинационной спектроскопии ближней инфракрасной области с преобразованием Фурье расширило возможности применения данного метода в биомедицинских целях. Изучение фундаментальных процессов, происходящих в структурах, содержащих металлические наночастицы, создание новых систем, их апробация и усовершенствование необходимы для успешного внедрения новых методов и подходов, например, к исследованию биологических объектов. Диссертационная работа Зюбина Андрея Юрьевича имеет прямое отношение к этим исследованиям. В связи с этим очевидны ее актуальность и практическая значимость.

Особенностью диссертационной работы является решение ряда методологических задач, связанных с подготовкой пленок ПВС на поверхностях шероховатого стекла с НЧ серебра, а также применение оптических методов к исследованию биологических объектов – сывороточного альбумина человека (САЧ) и АТФ. Сывороточный альбумин составляет более половины от всех белков в плазме крови. Этот белок изучен достаточно хорошо. Являясь активным «транспортным средством», он, в частности, способен связывать

лекарственные препараты и различные токсичные вещества. Его синтез зависит от состояния организма, а некоторые заболевания, к числу которых относится сепсис, оказывают влияние на производство САЧ. Данные о модификации структуры альбумина при развитии патологий противоречивы (от отсутствия конформационных изменений белка до его частичной денатурации). В диссертационной работе рассматриваются спектральные особенности этого белка при развитии сепсиса.

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, списка цитируемой литературы и 2 приложений. Работа изложена на 160 страницах, содержит 54 рисунка и 9 таблиц. Список литературы включает 239 наименований.

Во введении приводятся необходимые сведения о работе, отмечены ее актуальность, новизна и практическая ценность, сформулирована цель, перечислены задачи, предмет и методы исследования. Приводятся положения, выносимые на защиту, содержатся сведения о личном вкладе автора, об апробировании результатов работы.

Первая глава диссертации содержит обзор современного состояния методов флуоресцентной и ИК спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, их применения для анализа структуры и свойств биологических молекул. Рассмотрены теоретические основы описания и использование плазмонных эффектов в оптической спектроскопии, проанализированы особенности химических и физических методов синтеза наночастиц серебра.

Во второй главе подробно описано изготовлениеnanostructured плазмонных материалов, включая синтез наночастиц серебра, изготовление модифицированных шероховатых стекол и выделение белковой экстракции сывороточного альбумина человека. Здесь же описаны экспериментальные установки и даны необходимые сведения об использовании методов флуоресцентной и ИК спектроскопии, поверхностно-усиленного комбинационного рассеяния, приведена методика определения внутриклеточного и внутримитохондриального АТФ у детей с острым лимфобластным лейкозом.

Третья глава диссертации посвящена исследованию комбинационного рассеяния и флуоресценции молекул родамина бж на шероховатом стекле и в пленках поливинилового спирта с наночастицами серебра. Рассмотрено влияние температурной обработки на морфологию и структурные свойства шероховатых стекол, приводятся результаты по рассмотрению металл-усиленной флуоресценции и поглощения молекул родамина бж в матрице поливинилового спирта и на поверхности шероховатого стекла.

В четвертой главе приведены результаты спектроскопических исследований структуры молекулы САЧ и рассмотрена флуоресценция остатка триптофана в норме и при сепсисе. Для анализа конформационных изменений сывороточного альбумина человека

используется спектроскопия поверхностно-усиленного комбинационного рассеяния света, ИК-Фурье и флуоресцентная спектроскопия, в том числе поляризованная флуоресценция.

Самая короткая пятая глава содержит результаты исследований, которые легли в основу разработки флуоресцентного метода анализа концентрации аденоинтрифосфата (АТФ) в клетках крови и митохондриях.

Новизна выполненной работы заключается в использовании биосовместимых модельных матриц (шероховатое стекло, ПВС с внедренными НЧ серебра) для усиления флуоресценции, поглощения и комбинационного рассеяния, в проведении сравнительного анализа оптических свойств сывороточного альбумина человека в норме и при сепсисе.

Достоверность полученных научных результатов обеспечивается использованием апробированных методик измерения, повторяемостью и согласованностью результатов, публикацией основных положений диссертации в рецензируемых журналах и их обсуждением на международных и всероссийских симпозиумах и конференциях.

При чтении диссертации возникает ряд вопросов. Стоит подчеркнуть, что работа с биологическими макромолекулами требует особого подхода. Несмотря на то, что диссертационная работа Зюбина Андрея Юрьевича представлена на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности «оптика», целый ряд вопросов связан с состоянием объектов исследования и с процессом пробоподготовки.

Вопросы и замечания.

1. Как определяется концентрация наночастиц серебра в образцах?
2. На рис. 3.9 (рис. 1 автореферата) существенное увеличение поглощения РБЖ в пленке ПВС на шероховатом стекле, модифицированном НЧ серебра (например, при концентрации наночастиц $4,5 \times 10^{-10}$ М – более чем в 2,5 раза), сопровождается сравнительно малым (менее чем в 1,2 раза) увеличением интенсивности люминесценции. Это не позволяет говорить о возрастающей флуоресценции РБЖ в рассматриваемых условиях. Почему не приведены спектры возбуждения, которые в какой-то мере прояснили бы этот результат?
3. Вызывает вопросы и выполненный расчет оценки параметров переноса энергии с использованием модели Фёрстера (стр. 99). В диссертации отмечается: «При увеличении концентрации серебра вследствие безызлучательного переноса электронной энергии с НЧ на молекулы красителя происходит увеличение их поглощательной способности» (стр. 98) и «Поскольку максимум поглощения НЧ серебра (средний диаметр 64 нм) приходился на длину волны $\lambda = 416$ нм, а максимум флуоресценции РБЖ находится в области 570 нм, то можно ожидать, что в результате частичного перекрытия спектров, усиления флуоресценции в

результате безызлучательного dd-переноса по Ферстру с РБЖ на НЧ серебра» (стр. 99). О каком переносе и каком перекрывании идет речь?

4. В диссертации в главе 2 описывается способ выделения САЧ, где указано: «денатурирующий агент частично убирался, и часть САЧ переводилась в исходное состояние». Не означает ли это, что при использовании разных проб наличие остатков денатурирующего агента и приводило к вариации экспериментальных данных (в частности, на стр. 110 отмечено, что «повторяемости сигнала КР белковой молекулы достичь не удалось»).
5. Вызывает удивление спектральный сдвиг при использовании САЧ, выделенного из крови больных, по сравнению с САЧ в норме – рис. 4.9 диссертации и 4 автореферата (на рисунке 4.9 и в тексте диссертации ошибочно длина волны дана в см^{-1}). Как известно, при сравнении люминесценции триптофана в составе белка (обычно около 343 нм) и в свободном состоянии в растворе (348-350 нм) этот сдвиг существенно меньше (при денатурации белков максимум сдвигается к 350 нм). На стр. 120 в качестве возможной причины рассматривается наличие «слабокислой среды окружения белковой глобулы вследствие использования 5% раствора сульфосалициловой кислоты для осаждения белка из плазмы». Относится ли это только к «патологическому» САЧ? Контролировали ли степень чистоты белка САЧ, величину pH в используемых для приготовления образцов пробах и ионную силу раствора (зарядовые свойства белка играют важную роль в определении его конформации)?
6. Диагноз «сепсис» имеет различную этиологию (вызываемая различными микроорганизмами, сопровождаться разной реактивностью организма). Это может вызывать разное течение болезни у разных пациентов и, как следствие, сказываться на состоянии белка САЧ. Кроме того, огромное значение имеет вопрос о том, какую терапию проходили пациенты до забора крови, так как белок активно связывается с лекарствами и может изменять свою конформацию именно из-за этого (этот вопрос частично затронут при описании данных ИК-Фурье спектроскопии). Большую роль играет также возраст пациентов. Как решали такие вопросы при определении состояния белка САЧ «в патологии»?
7. На стр. 124 обсуждается перенос энергии в системах САЧ - наночастицы серебра в норме и при патологии. Различие в значениях критического радиуса переноса и расстояния между донором и акцептором автор связывает с тем, что «наночастицы легче агрегируют на поверхности центров связывания белка» для патологической («менее упорядоченной») формы. Есть ли основания говорить именно о связывании наночастиц серебра с молекулами белка?
8. Как приведенные на стр. 125 значения степени поляризации флуоресценции соотносятся с рис. 4.11?
9. Изменение конформации белка, фиксируемое экспериментально, должно иметь понятную физико-химическую причину. Каковы возможные причины конформационных изменений САЧ при сепсисе?

10. Следует отметить опечатки в работе (особенно обилие лишних запятых и реже – их недостаток) и неудачные выражения, например: «...частоты компонентов амидной группы I тесно коррелируют с каждым вторичным структурным элементом белка» (стр. 24), «...которые обусловлены изменением внутренней поверхности пор и изменением степени вязкости их каркаса» (стр. 91). Что автор подразумевает под неоднократно встречаемым в диссертационной работе и в автореферате выражением «*α*-трубчатые слои в молекуле белка»?

Высказанные замечания в целом не снижают значимость работы. Получен большой объем экспериментальных данных, использованы различные современные и информативные методы исследования, проведена большая методическая работа, разработаны новые структуры для использования в ГКР, получены новые данные о свойствах биологических молекул. Все основные результаты работы опубликованы в рецензируемых изданиях. Автореферат диссертации полностью отражает содержание работы.

Диссертационная работа «Спектрально-кинетические исследования фотофизических процессов с участием молекул красителей и биомолекул в присутствии наночастиц серебра» отвечает требованиям ВАК к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук (п.9 Положения о присуждении ученой степени, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013, ред. от 30.07.2014), а ее автор Зюбин Андрей Юрьевич заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 — «оптика».

Доктор физико-математических наук,
профессор кафедры молекулярной
биофизики и физики полимеров
физического факультета СПбГУ

Касьяненко Нина Анатольевна

198504, Россия, г. Санкт-Петербург, г. Петродворец, ул. Ульяновская, д. 1, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», физический факультет, кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров

Тел. +7(812)428-43-88

Электронный адрес: spbu@spbu.ru; <https://spbu.ru/>

Личную подпись заверяю

НАЧАЛЬНИК ОТДЕЛА КАДРОВ №3

Н. И. МАШТЕРА

Документ подготовлен
в порядке исполнения
трудовых обязанностей