

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора химических наук Уточниковой Валентины Владимировны
о диссертационной работе Ровнягиной Наталии Романовны
«Флуоресцентная спектроскопия фибриллярных наноструктур:
взаимодействие с флуоресцентным зондом тиюфлавином Т
и возможности в исследовании кинетики агрегации»,
представленной на соискание учёной степени кандидата
физико-математических наук по специальности 1.3.6. Оптика

Диссертационная работа Н.Р. Ровнягиной посвящена комплексному экспериментальному исследованию изучению фотофизических процессов, происходящих при связывании флуоресцентного зонда тиюфлавина Т (ThT) с белковыми макромолекулами и их агрегатами, в частности нерастворимыми нитевидными агрегатами, образующимися в результате неправильного сворачивания белков и вовлеченными в патогенез нейродегенеративных заболеваний. Актуальность темы обусловлена фундаментальными пробелами в понимании механизмов, ответственных за формирование фотофизических свойств флуоресцентного зонда тиюфлавина Т (ThT), неспецифическое связывание с глобулярными белками которого затрудняет детектирование фибрилл в реальных системах, например, биожидкостях, где концентрации мономеров белков и фибрилл могут различаться на 9 порядков.

Диссертация структурирована логично и последовательно: она включает введение, четыре содержательные главы и заключение. Общий объём составляет 173 страницы машинописного текста, содержит 44 рисунка и 10 таблиц, а список литературы включает 152 источника, отражающих как классические, так и современные достижения в области формирования фотофизических свойств тиюфлавина Т.

Во введении обоснована научная и прикладная актуальность исследования, сформулированы цель и задачи работы, определены её научная новизна и практическая значимость. Приведены сведения об апробации результатов на ведущих российских и международных конференциях и публикациях по теме диссертации.

В первой главе представлен обзор экспериментальных и теоретических работ, посвященных тематике диссертации. Приводятся основные сведения о взаимосвязи структуры зонда тиюфлавина Т и его спектральных и фотофизических свойств. Рассматриваются гипотезы, объясняющие изменения флуоресцентных свойств ThT при связывании его с фибриллярными наноструктурами. Проводится анализ молекулярных механизмов специфического связывания ThT с амилоидными фибриллами и причин, лежащих в основе увеличения квантового выхода флуоресценции ThT при встраивании его в фибриллы. Рассматривается гипотеза о формировании

флуоресцентных димеров, эксимеров и мицелл ThT при встраивании его в фибриллярные наноструктуры. Рассматривается модель, описывающая фотофизические процессы в тиюфлавине Т на основе рассмотрения его как молекулярного ротора, конформационная подвижность которого определяется вязкостью микроокружения. Анализируются данные квантово-химических расчетов основного и возбужденного состояний ThT. Производится анализ параметров комплексообразования тиюфлавина Т с различными макромолекулами. Описываются используемые экспериментальные методы. Приводится обзор основ стационарной и время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии, абсорбционной спектроскопии, метода ап-конверсии флуоресценции, а также методов динамического светорассеяния и анализа траектории наночастиц.

Во второй главе впервые было продемонстрировано, что асинхронное изменение времени жизни и интенсивности флуоресценции ThT при неспецифичном взаимодействии с белком связано с наличием фракции молекул ThT со сверхбыстрым затуханием флуоресценции (~ 1 пс). Наличие данной фракции было зарегистрировано при измерении кинетики затухания флуоресценции с субпикосекундным разрешением с помощью метода ап-конверсии флуоресценции. Было также показано, что наличие данной фракции является общей чертой неспецифического взаимодействия ThT с белками и олигомерами белка.

Третья глава представляет собой систематическое всестороннее исследование кинетики формирования фибриллярных наноструктур. В данной главе было произведено описание различных стадий формирования фибриллярных наноструктур с использованием комплекса оптических методов: стационарной и время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии, анализа траектории наночастиц и динамического рассеяния света. Был также осуществлён поиск оптических индикаторов различных стадий фибриллообразования и произведен анализ чувствительности применяемых методик при образовании олигомеров разного размера. Было показано, что параметры, определенные с помощью используемых методов, являются индикаторами одного и того же процесса – образования агрегатов более высокого порядка, но демонстрируют разное поведение кинетики вследствие чувствительности и динамического диапазона каждого метода.

Четвертая глава посвящена разработке и экспериментальной реализации нового метода молекулярно-специфической визуализации на основе эффекта насыщения флуоресценции с использованием стандартного конфокального микроскопа. В главе представлена теоретическая модель и продемонстрирована возможность картирования безразмерного параметра $F\sigma t$ (произведение плотности потока фотонов, сечения поглощения и времени жизни флуорофора) для зонда ThT. Результаты показывают, что предложенная методика позволяет в два раза повысить контраст визуализации гетерогенных

фибриллярных структур по сравнению с традиционной конфокальной микроскопией.

В заключении обобщены ключевые результаты работы, подтверждающие её научную новизну и практическую ценность. Все основные положения диссертации подкреплены экспериментальными данными, согласуются с теоретическими оценками и численным моделированием, а также опубликованы в научных статьях, включая работы в международных журналах.

Диссертационная работа выполнена на достойном научном уровне, апробирована в достаточной степени публикациями в соответствующих исследовательской области научных журналах. Основными достоинствами я считаю следующие:

- Автору удалось дать убедительное физическое объяснение асинхронному изменению интенсивности и времени жизни флуоресценции тиофлавина Т при связывании как с мономерными белками, так и в процессе фибриллогенеза. Сильной стороной работы является не только логическая стройность, но и универсальность предложенной автором концептуальной модели. Крайне важно, что эта идея – гипотеза о существовании различных мод связывания зонда, характеризующихся разными константами ассоциации и фотофизическими параметрами – оказалась плодотворным ключом для объяснения всего спектра явлений, наблюдаемых как при неспецифическом связывании с рядом глобулярных белков, так и в динамике специфического взаимодействия с растущими фибриллами. Способность единой модели последовательно описать асинхронное поведение интенсивности и времени жизни флуоресценции в столь разных системах является значительным теоретическим достижением работы.
- Разработан и апробирован принципиально новый, ресурсоэффективный подход к получению молекулярно-специфического контраста – метод картирования параметра насыщения флуоресценции ($F_{\max}\sigma\tau$) на стандартном конфокальном микроскопе с непрерывным возбуждением. Это решение можно охарактеризовать как «FLIM без FLIMa», поскольку оно позволяет получать информацию, функционально аналогичную картам времени жизни (параметр $\sigma\tau$), но без необходимости использования сложного и дорогостоящего импульсного лазерного источника и скоростной электроники для временной корреляции.

Автореферат соответствует тексту диссертационной работы.

По содержанию работы имеются следующие замечания:

- 1) В анализе кинетики затухания методом TCSPC (временное разрешение ~ 200 пс) автор отождествляет самую быструю компоненту (~ 200 пс) с флуоресценцией свободного ThT, имеющего истинное время жизни ~ 1 пс. Несмотря на сделанные в работе оговорки о приблизительности такого отождествления, использование этого конкретного численного значения

(~200 пс, а не ~1 пс) в последующих расчетах амплитуд и констант связывания вызывает некоторые вопросы.

- 2) В разделе 3.3 делается вывод о корреляции роста времени жизни (τ) ThT с появлением агрегатов размером ~100 нм по данным ДРС и АТН. Однако данные ДРС (рис. 33а, красные символы) показывают резкий рост $\log(D)$ уже на самых ранних этапах (до 90 мин), когда τ почти не меняется. Рост τ начинается позже, уже на "плато" $\log(D)$. Утверждение о прямой корреляции выглядит упрощенным. Требуется более осторожная и детализированная интерпретация: рост размера частиц (ДРС) опережает изменение τ , а синхронно с ростом τ меняется, возможно, не средний размер, а гетерогенность системы (ширина распределения).
- 3) В экспериментах по связыванию ThT с белками (например, рис. 22) используются высокие концентрации белка (до 780 мкМ). Хотя в разделе 2.1 упоминается корректировка на внутренний фильтр, не приведены конкретные значения оптической плотности при длинах возбуждения (410 нм) и излучения (макс. ~480 нм) для этих концентрированных растворов. При высокой OD (>0.1) даже корректировки могут быть недостаточны, что может исказить как стационарные спектры, так и кинетику затухания (эффект дифференциального затухания). Необходимо представить эти данные или обосновать пренебрежимость эффекта.
- 4) В главе 4 представлен элегантный метод картирования параметра $F_{\max}$ от. Однако его валидация путем прямого сравнения с классическим FLIM для одной и той же области образца не приведена. Есть только общие данные по системе $F_{\text{мос}}$ -FF из разных экспериментов (рис. 43 и 44). Для убедительной демонстрации метода необходимо было представить сопоставительную карту: для одной области образца получить карту $F_{\max}$ от (конфокальным микроскопом) и карту времен жизни τ (FLIM), и показать их пространственную корреляцию.

Все вопросы носят исключительно уточняющий характер. Сделанные замечания формальны и не влияют на ценность проделанной работы и не снижают ее высокой оценки. Получено достаточно большое количество важных и новых результатов, что способствовало пониманию процессов в области флуоресцентной спектроскопии белков и фибриллярных наноструктур с использованием флуоресцентного зонда тиюфлавина Т.

Считаю, что диссертация «Флуоресцентная спектроскопия фибриллярных наноструктур: взаимодействие с флуоресцентным зондом тиюфлавином Т и возможности в исследовании кинетики агрегации» соответствует специальности 1.3.6. Оптика (по физико-математическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1–2.5 «Положения о присуждении учёных степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова», предъявляемым к кандидатским диссертациям, и оформлена согласно приложениям № 8 и 9 «Положения о совете по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук Московского государственного университета

имени М.В. Ломоносова», а её автор — Ровнягина Наталия Романовна — заслуживает присуждения учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.6. Оптика.

Официальный оппонент:

Уточникова Валентина Владимировна,
доктор химических наук

Место работы и должность:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», факультет наук о материалах, кафедра наноматериалов, профессор

_____ В.В. Уточникова
«5» февраля 2026 года

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 73
Телефон: +7 (495) 939-50-74
E-mail: pk@fnm.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена докторская диссертация:

02.00.01 — Неорганическая химия

Подпись Уточниковой Валентины Владимировны ЗАВЕРЯЮ:

Зав. канцелярией

_____ В.П. Родионова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», факультет наук о материалах

Телефон: +7 (495) 932-85-33

E-mail: pk@fnm.msu.ru