

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

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

Актуальность избранной темы

Флуоресцентный краситель тиофлавин Т (ThT) широко применяется в биологических экспериментах и гистологии для количественного определения белковых агрегатов и фибрилл. При инкорпорировании в структуру фибриллы, в частности, при взаимодействии с инсулином или другими белками, тиофлавин значительно увеличивает интенсивность и время жизни флуоресценции, что позволяет точно идентифицировать патологические состояния. Поскольку образование амилоидных фибрилл сопровождается развитием целого ряда тяжелых и социально-значимых заболеваний, например, нейродегенеративных заболеваний и сахарного диабета второго типа, изучение их структуры и механизмов образования имеет важное значение для диагностики.

Диссертационная работа Н. Р. Ровнягиной посвящена детальному изучению фотофизических основ взаимодействия «золотого стандарта» детектирования амилоидных фибрилл, флуоресцентного зонда тиофлавина Т (ThT), с белковыми структурами различного уровня организации. Данная проблема находится на стыке биофизики, биомедицины и оптики, а понимание этих основ критически необходимо для интерпретации и количественного анализа данных в исследованиях с применением указанного красителя. Так что тема диссертационной работы Н. Р. Ровнягиной актуальна.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Сформулированные в диссертации Ровнягиной Н. Р. научные положения и выводы основаны на результатах собственных экспериментальных исследований. Все полученные автором результаты подробно описаны в соответствующих главах и наглядно иллюстрированы. Их обоснованность и корректность обуславливается внушительной теоретической базой, грамотно поставленным дизайном исследования, достаточным объемом экспериментального материала, применением адекватных методов статистического анализа, а также общей логикой построения диссертационной работы. Сделанные в работе выводы находятся в соответствии с поставленными задачами.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Работа выполнена на высоком методическом уровне. Для решения поставленных задач автор использовал ряд современных методов: спектрофлуориметрию, лазерную кинетическую флуоресцентную спектроскопию, метод ап-конверсии флуоресценции с временным разрешением, время-разрешенную флуоресцентную микроскопию, микроскопию насыщения флуоресценции с использованием конфокального микроскопа, гель-фильтрационную хроматографию. Все поставленные задачи глубоко проработаны.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Основные положения и выводы полностью отражают результаты проведенных исследований. Проведенное Ровнягиной Н. Р. исследование содержит новые, интересные данные о фотофизических свойствах теофлавина при взаимодействии с белками и фибриллярными структурами. Достоверность результатов подтверждается их широким опубликованием в высокорейтинговых, рецензируемых научных журналах. Результаты диссертационной работы представлены в 5 статьях в зарубежных журналах высокого уровня (Q1). Результаты диссертации докладывались автором на всероссийских и международных конференциях.

Структура и содержание диссертации

Структура работы логична и включает введение, 4 главы и заключение. Работа изложена на 173 страницах, содержит 44 рисунка, 10 таблиц и 152 источника литературы. В конце диссертации приведен список собственных публикаций автора, на каждую из которых имеется ссылка в тексте.

Примечательно, что после каждой главы изложены основные выводы по данной части работы, что систематизирует представленный материал и делает удобным знакомство с работой.

Во **введении** чётко обоснована актуальность исследования, сформулированы цель и задачи, определены научная новизна и практическая значимость работы, приведены сведения об апробации и публикациях.

Первая глава представляет собой глубокий аналитический обзор современных представлений о механизмах, стоящих за общепринятой моделью формирования фотофизических свойств теофлавина Т по принципу молекулярного ротора, а также механизмах его специфического и неспецифического связывания с белковыми структурами и существующих методах их исследования. Обзор качественно выполнен и служит прочной теоретической основой для последующих экспериментальных исследований автора.

Во **второй главе** исследовано неспецифическое взаимодействие ThT с мономерами и олигомерами белков (альбумином, α -лактальбумином и др.). С помощью набора надежных методов (стационарная и время-разрешённая флуоресцентная спектроскопия, гель-фильтрационная хроматография, ап-конвер-

сия) впервые детально изучен феномен асинхронного изменения интенсивности и времени жизни флуоресценции ThT. Автор убедительно показал, что этот эффект обусловлен наличием и «маскировкой» значительной доли молекул ThT со сверхбыстрой релаксацией (~ 1 пс), вклад которых не разрешается в установках с субнаносекундным временным разрешением. Важным результатом является выявление двух мод связывания ThT с альбумином, соответствующих мономерной и димерной фракциям белка. Этот вывод имеет принципиальное значение для корректной оценки взаимодействия лигандов с альбумином.

Третья глава работа сосредоточена на изучении специфического взаимодействия ThT с фибриллярными наноструктурами в процессе их формирования. Продемонстрировано, что асинхронность изменения интенсивности флуоресценции и среднего времени жизни флуоресценции τ наблюдается и в этом случае. С помощью методов ап-конверсии, динамического светорассеяния и анализа траекторий наночастиц установлена корреляция между ростом τ и появлением в системе популяции олигомеров/агрегатов размерами ~ 100 нм, в то время как резкий рост интенсивности флуоресценции происходит на более поздних стадиях, связанных с формированием зрелых фибрилл и увеличением их концентрации. Комбинация фотофизических и морфологических методов позволила внести ясность в понимание процесса формирования фибрилл.

В четвёртой главе предложен и экспериментально апробирован новый метод молекулярно-специфичной визуализации на основе эффекта насыщения флуоресценции в стандартном конфокальном микроскопе. Показано, что картирование безразмерного параметра $F\sigma\tau$ позволяет повысить контраст изображения гетерогенных систем (фибриллярных гидрогелей) по сравнению с традиционной конфокальной микроскопией с использованием ThT. Разработка методики, не требующей модификации оборудования, представляет значительный практический интерес для биоимиджинга.

В заключении сформулированы основные выводы, полностью соответствующие поставленным задачам и положениям, выносимым на защиту.

Автореферат соответствует тексту диссертационной работы.

Научная и практическая значимость полученных результатов

Полученные в работе результаты имеют важное фундаментальное и прикладное значение. Научная значимость полученных результатов диссертационного исследования состоит в раскрытии фотофизических механизмов изменения флуоресценции тиофлавина в присутствии белка и его свойств как молекулярного ротора. Установленные автором количественные метрики затухания флуоресценции тиофлавина важны для более точного описания локального микроокружения белковых агрегатов и фибриллярных структур. Практическое значение работы заключается в том, что анализ времен релаксации тиофлавина может предоставить новую диагностическую информацию для клинических задач.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием ряда современных оптических методов. Результаты работы глубоко осмысленны и изложены в логичной форме. Текст диссертации написан грамотным научным языком. Все основные теоретические изыскания и собственные экспериментальные результаты сопровождаются наглядными рисунками и таблицами. И диссертация, и автореферат аккуратно оформлены. Для понимания этой объемной работы удобно, что методы и подходы, соответствующие отдельным блокам работы, представлены в начале каждой главы, а не вынесены отдельно.

Интересными находками автора видится следующее:

1. Автором предложена оригинальная методика микроскопии насыщения флуоресценции, реализуемая на основе стандартного конфокального микроскопа. Данный метод может быть полезен для охарактеризования локального окружения флуорофора как альтернатива время-разрешенной флуоресцентной микроскопии. Тем не менее, представляется интересным дальнейшее сопоставление данных микроскопии насыщения флуоресценции и FLIM микроскопии.
2. Автором предложено объяснение для асинхронного поведения кинетики интенсивности и времени жизни флуоресценции ThT. Использование спектроскопии с субпикосекундным возбуждением (ап-конверсии флуоресценции) позволило непосредственно зарегистрировать доминирующую фракцию свободного и связанного ThT со сверхбыстрой релаксацией (~ 1 пс), «невидимую» для наносекундных методов. Этот результат меняет подход к анализу кинетики связывания ThT.
3. Автором доказано, что ThT имеет более высокую аффинность к димерной фракции альбумина, что является важным практическим результатом в области исследований, изучающих связывание малых молекул с сывороточным альбумином. Игнорирование олигомерных форм может приводить к существенным ошибкам в определении констант связывания.

В целом работа производит очень хорошее впечатление. Ровнягиной Н.Р. получено внушительное количество новых результатов, что способствует лучшему пониманию не только фотофизики красителя тиофлавина, но и процессов формирования фибриллярных белковых структур, имеющих диагностическое значение в медицине.

По содержанию работы имеются некоторые вопросы:

1. Один из основных результатов работы – регистрация в кинетике затухания флуоресценции тиофлавина сверхбыстрой компоненты с временем жизни ~ 1 пс. Между тем, времена жизни флуоресценции у большинства органических флуорофоров лежат в диапазоне наносекунд. Каков предполагаемый механизм такого сверхбыстрого затухания флуоресценции

- для молекулы тиофлавина?
2. Для анализа мод встраивания в альбумин кинетика затухания флуоресценции тиофлавина аппроксимировалась 3-х экспоненциальной функцией. Требуется уточнить, чем обоснован выбор трех экспонент и какова была точность аппроксимации (например, по критерию «хи-квадрат»).
 3. Для получения данных о кинетике затухания флуоресценции ThT автором использован ряд модельных объектов в виде растворов альбумина и фибриллярного гидрогеля. Между тем, тиофлавин Т широко применяется в биологических исследованиях и гистологии для окраски амилоидных фибрилл. Возможно ли, по мнению автора, использование время-разрешенных флуоресцентных методов в комбинации с тиофлавином для оценки агрегированных состояний белков и структуры фибрилл в более сложных объектах (например, клетках или срезах тканей)?
 4. По тексту работы автор неоднократно указывает, что структура и размеры агрегатов белков и фибрилл высоко гетерогенны. При окраске тиофлавином это предполагает присутствие молекул тиофлавина в различном микроокружении и, соответственно, состоянии. Используя экспоненциальную аппроксимацию для анализа кривых затухания, автор ограничивает анализ 2-3 модами. Хотелось бы узнать мнение автора, относительно использования фазового анализа для более полного охарактеризования микроокружения флуорофора.
 5. В главе 4 автором показана возможность картирования параметра насыщения флуоресценции для получения данных о состоянии фибрилл. Хотелось бы уточнить, в чем преимущества и ограничения этого метода по сравнению с FLIM микроскопией и может ли микроскопия насыщения флуоресценции с тиофлавином быть реализована на клетках или тканях.

Несколько замечаний касаются оформления работы. Так, на рисунке 33 в диссертации не указаны погрешности измерений для времени жизни и интенсивности флуоресценции ThT; На странице 52 в предложении «...изменение интенсивности Fluo и среднего времени жизни флуоресценции ThT τ используется в качестве индикатора формирования фибрилл [68]» – отсутствует ссылка на рисунок 15. По тексту диссертации и автореферата встречаются опечатки.

Все вопросы носят исключительно уточняющий характер. Сделанные замечания формальны и не влияют на ценность проделанной работы и не снижают её высокой оценки.

Считаю, что диссертация «Флуоресцентная спектроскопия фибриллярных наноструктур: взаимодействие с флуоресцентным зондом тиофлавином Т и возможности в исследовании кинетики агрегации» соответствует специальности 1.3.6. Оптика (по физико-математическим наукам), а также критериям, определённым 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:

Ширманова Марина Вадимовна,
доктор биологических наук

Место работы и должность:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научно-исследовательский институт экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий, заместитель директора по науке

_____ М.В. Ширманова

«2» февраля 2026 года

Адрес места работы:

603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1
Телефон: +7 (831) 465-56-72
E-mail: shirmanova_m@pimunn.net

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена докторская диссертация:

1.5.2. Биофизика (биологические науки)

Подпись Ширмановой Марины Вадимовны ЗАВЕРЯЮ:

Учёный секретарь университета
кандидат биологических наук, доцент _____ Сорокина Ю.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Телефон: +7 (831) 422-12-50

E-mail: rector@pimunn.net