

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора физико-математических наук Ященко Алексея Михайловича
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

Диссертационная работа Наталии Романовны Ровнягиной посвящена фундаментальному исследованию фотофизических механизмов, лежащих в основе усиления флуоресценции зонда тиофлавина Т при его связывании с белковыми агрегатами. В работе экспериментально исследуются причины расхождения между интенсивностью флуоресценции и временем жизни флуоресценции тиофлавина Т и предлагается новый метод конфокальной микроскопии насыщения для повышения специфичности визуализации белковых агрегатов.

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения и списка использованных источников. Объём работы составляет 173 стр. и включает 44 рисунка, 10 таблиц и 152 источника научной литературы.

Во введении автором представлена актуальность темы, цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы. Приводятся сведения об объектах и методах исследования. Сформулированы защищаемые положения и представлены сведения о публикациях и апробации работы. Представлено краткое содержание работы.

В первой главе, автором выполнен обзор научной литературы о современном состоянии исследований по теме диссертационной работы. В главе систематизированы современные представления о тиофлавине Т, как о молекулярном роторе, механизмах его взаимодействия с белками и существующих методических подходах к изучению формирования фибрилл.

Вторая глава посвящена исследованию связывания тиофлавина Т с рядом глобулярных белков и их низкомолекулярными олигомерами. Используя стационарную флуоресцентную спектроскопию, время-коррелированный счет единичных фотонов с наносекундным разрешением и гель-фильтрационную хроматографию, автором впервые детально изучено асинхронное изменение

интенсивности флуоресценции и времени жизни возбужденного состояния тιοфлавина Т. Экспериментально показано различие интенсивности флуоресценции и времени жизни, что обусловлено наличием преобладающей фракции молекул тιοфлавина Т, как свободных, так и связанных с белком, обладающих сверхбыстрой релаксацией возбужденного состояния. Важным дополнительным результатом, является выявление двух различных мод связывания тιοфлавина Т с альбумином, соответствующих его мономерной и димерной фракциям.

В третьей главе автором исследуется связывание тιοфлавина Т с амилоидными фибриллами в процессе их формирования из мономеров инсулина. В результате проведенных исследований был выявлена асинхронность изменения интенсивности флуоресценции и времени жизни возбужденного состояния, наблюдаемая при связывании тιοфлавина Т с белками и их олигомерами. Для объяснения механизмов, лежащих в основе данной асинхронности в процессе фибриллогенеза, был применен комплексный подход. С помощью апконверсии флуоресценции установлено, что на стадии, когда время жизни достигает плато, в системе присутствует значительная доля связанных молекул тιοфлавина Т со сверхбыстрой релаксацией, что объясняет относительно низкое усиление интенсивности флуоресценции на этом этапе. Применение методов динамического светорассеяния и анализа траекторий наночастиц позволило напрямую отследить морфологические изменения в системе. Таким образом, работа устанавливает прямую взаимосвязь между изменением фотофизических параметров зонда и конкретными стадиями формирования фибрилл, уточняя существующие модели кинетики амилоидной агрегации.

Четвертая глава представляет собой прикладной результат фундаментального исследования фотофизики тιοфлавина Т и посвящена разработке, теоретическому обоснованию и экспериментальной проверке нового метода молекулярно-специфической визуализации. В основе метода лежит эффект насыщения интенсивности флуоресценции от мощности возбуждения, что позволяет картировать безразмерный параметр насыщения. Метод был реализован на серийном конфокальном микроскопе без его аппаратной модификации, для чего была разработана соответствующая методика получения и анализа серии изображений при различных интенсивностях возбуждения. Экспериментальная апробация проведена на модельной гетерогенной системе — фибриллярном гидрогеле, окрашенном тιοфлавином Т. Показано, что картирование параметра насыщения обеспечивает двукратное повышение контраста при визуализации фибриллярных структур по сравнению со стандартным

конфокальным изображением, основанным только на интенсивности флуоресценции. Предложенная методика расширяет функционал стандартных конфокальных систем, предоставляя дополнительную, молекулярно-специфичную модальность для биоимиджинга с повышенной чувствительностью к фотофизическим свойствам флуорофора.

В заключении сформулированы основные результаты и выводы, полученные в диссертационной работе.

Экспериментальная часть работы выполнена с применением современного оборудования и передовых методик, что обеспечило высокую достоверность и воспроизводимость полученных данных. Весь комплекс результатов прошёл необходимую научную апробацию и представлен в серии статей, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных базах данных. Полученные научные результаты, находятся в полном соответствии с первоначально сформулированными целью и задачами исследования, а также с положениями, выносимыми на защиту.

Следует особо отметить следующие важные достижения работы:

- Корректное объяснение ранее экспериментально наблюдаемого при исследовании фибриллообразования явления асинхронного поведения кинетики интенсивности и времени жизни флуоресценции тиофлавина Т. Использование спектроскопии с субпикосекундным возбуждением позволило непосредственно зарегистрировать доминирующую фракцию свободного и связанного тиофлавина Т со сверхбыстрой релаксацией. Этот результат меняет подход к анализу кинетики связывания тиофлавина Т.
- Подтверждение, что тиофлавин Т имеет более высокую аффинность к димерной фракции альбумина, является важным практическим результатом в области исследований связывания низкомолекулярных структур с сывороточным альбумином. Игнорирование олигомерных форм может приводить к существенным ошибкам в определении констант связывания.

Автореферат соответствует тексту диссертационной работы.

В то же время к работе имеется ряд замечаний:

- Автор при измерениях интенсивности флуоресценции и времени жизни комплекса красителя-белок/фибриллы проводит нормировку/сравнение со знаменателями интенсивности флуоресценции и времени жизни для свободно красителя в воде. Однако, комплексообразование происходит в

буферных растворах. Для сравнения корректно было бы использовать значения параметров для свободного красителя в буферном растворе.

- В главе 2 при исследовании поглощения тиюфлавина Т при образовании комплексов с олигомерными фракциями альбумина на 410 нм использовался метод гель-фильтрации для разделения белковых фракций связанных с тиюфлавином Т. Из представленных данные не ясно проводились ли контрольные исследования при тех же условиях для образца тиюфлавина Т без альбумина. Поскольку молекулы красителя могут собираться в агрегаты и мицеллы буфере, даже при низких концентрациях красителя, такой контрольных эксперимент помог бы исключить их вклад в спектры поглощения.

- Белки, исследуемые в работе, отличаются изоэлектрической точкой, которая определяет общий заряд и конформацию белка в буфере (20 мМ Tris-HCl с pH 7.4). Учитывался ли этот фактор автором в работе.

- Стр. 56 автор заключает: «В амилоидных фибриллах ThT связывается в двух типах сайтов с высокой ($\sim 2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) и низкой ($\sim 4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) константами комплексообразования». Очевидно, что оба значения имеют один порядок, который характерен для высокой константы связывания. Видимо опечатка.

- В заключение к литературному обзору, автор вновь формулирует цели и задачи работы, что выглядит излишне, так как цели и задачи были даны ранее. Вместе с тем, хотелось бы видеть более развернутые выводы о проведенном обзоре состояния исследований в данной области.

- На рисунках 22 А, В, Д (стр. 76-77) концентрации белка отличаются. С чем связано отличие в концентрациях белка и может ли это различие влиять на получаемые значения интенсивности флуоресценции и времени жизни.

Вместе с тем, сделанные замечания не снижают, научную и практическую значимость работы.

Считаю, что диссертационная работа «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:

Ященко Алексей Михайлович,
доктор физико-математических наук

Место работы и должность:

Автономная некоммерческая образовательная организация
высшего образования «Сколковский институт науки и технологий»,
Центр фотоники и фотонных технологий, доцент

_____ А.М. Ященко
«30» января 2026 года

Адрес места работы:

121205, г. Москва, территория инновационного центра «Сколково»,
Большой бульвар, д. 30, стр. 1
Телефон: +7 (495) 280-14-81
E-mail: a.yashchenok@skoltech.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена докторская диссертация:

03.01.02 — Биофизика

Подпись Ященко Алексея Михайловича ЗАВЕРЯЮ:

Руководитель отдела
кадрового администрирования

_____ Гук О.С.

Автономная некоммерческая образовательная организация
высшего образования «Сколковский институт науки и технологий»

Телефон: +7 (495) 280-14-81

E-mail: inbox@skoltech.ru