

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Суржиковой Дарьи Павловны «Влияние переноса протона в основном и возбужденном состояниях на люминесцентные свойства ионных форм флуоресцеина», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.6. Оптика

Актуальность темы исследования

Флуоресцеин и его производные имеют особую значимость в современных научных исследованиях благодаря уникальным оптическим свойствам, которые сильно зависят от ионного состояния молекулы. Изучение влияния переноса протона на его люминесценцию представляет значительный интерес, поскольку этот процесс лежит в основе многих практических применений красителя.

Применение флуоресцеина и его аналогов в сенсорики открывает перспективы создания переключаемых оптических систем благодаря контролю люминесцентных свойств через изменение кислотности среды. Таким образом, изучение влияния переноса протона на люминесценцию флуоресцеина имеет как фундаментальное значение, так и практическую ценность для разработки новых функциональных материалов и аналитических технологий.

Все вышеизложенное определяет актуальность темы и своевременность диссертационной работы Суржиковой Дарьи Павловны, посвященной анализу вклада процессов переноса протона в основном и возбужденном состояниях на люминесцентные свойства ионных форм флуоресцеина.

Общее содержание диссертационного исследования

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений и списка публикаций. Общий объем диссертации 121 страница, включая 48 рисунков, и 11 таблиц. Список литературы содержит 157 наименований.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цели и задачи диссертационного исследования, отражаются сведения о научной новизне и о практической значимости полученных результатов; дано описание методов исследования; сформулированы основные положения, выносимые на защиту; обсуждается достоверность полученных результатов; приведены сведения об апробации материалов диссертации, публикациях и личном вкладе автора; описывается структура диссертации и объем.

Вх. № 287-03/6224/38
от 04.06.2025 г.

Литературный обзор в рамках **первой главы** включает описание главной проблемы диссертационной работы. В водном окружении флуоресцеин представляет собой смесь ионных форм с различными фотофизическими характеристиками, находящееся в равновесии между друг другом. Распределение долей ионных форм зависит от многих факторов, таких как рН, температура и т.д. Во флуоресцентные характеристики водных растворов флуоресцеина, существенный вклад вносит явление переноса протона в возбужденном состоянии, который осложняет интерпретацию спектров флуоресценции отдельных ионных форм флуоресцеина.

Вторая глава посвящена выявлению флуоресцентных свойств ионных форм флуоресцеина в водных растворах в широком диапазоне рН (0–14). Для этого было проведено моделирование долей ионных форм флуоресцеина в основном и возбужденном состояниях, в основе которого лежит схема кинетических процессов. Благодаря моделированию были найдены условия получения флуоресценции отдельных ионных форм. В эксперименте были получены спектральные характеристики катионной, хиноидной и моноанионной ионных форм флуоресцеина в возбужденном состоянии.

Третья глава посвящена анализу вклада механизмов, происходящих в основном и возбужденном состояниях, в абсорбционные и флуоресцентные сигналы при изменении температуры в диапазоне 283–353К. Температурная чувствительность спектров поглощения определяется сдвигом моноанион-дианионного равновесия в сторону значений меньших рН. Примечательным является то, что температурная чувствительность флуоресцентного сигнала также определяется несколькими факторами, но основным является сдвиг ионного равновесия в основном состоянии, что было показано моделированием. В работе была проведена оценка термометрических характеристик и найден диапазон рН (5,5–7) практического применения аналитического флуоресцентного ратиометрического сигнала флуоресцеина.

В **четвертой главе** приведены результаты анализа влияния разноразряженной поверхности белков на спектральные свойства флуоресцентной метки флуоресцеин-5-изотиоцианат (ФИТЦ). Было получено что изменение формы спектры поглощения связано с изменением ионного равновесия, а сдвиг максимума спектра с изменением полярности окружения при ковалентном связывании. В флуоресцентных исследованиях получены различные ратиометрические флуоресцентные сигналы, флуоресцентные времена жизни и анизотропии флуоресценции. Экспериментальные параметры были связаны теоретическими, полученными методами молекулярной динамики. Корреляционный анализ помог выявить

зависимость как абсорбционных характеристик, так и флуоресцентных от заряда поверхности белка.

Каждая глава сопровождается заключением. В общем **заключении** сформулированы основные результаты, полученные в диссертационном исследовании. Выводы и заключения являются логичными, последовательными и в полной мере отражают суть проведенных исследований.

Основные научные результаты диссертационного исследования

К основным результатам диссертационного исследования можно отнести:

1. Создана программа для расчета населенности ионных форм в основном и возбужденном состояниях, которая позволила получить условия для измерения флуоресценции отдельных ионных форм. Найдены фотофизические характеристики возбужденных состояний катионной, хиноидной и моноанионной ионных форм в условиях, предсказанных моделированием. Определены направления и эффективность переноса протона в возбужденном состоянии.

2. Найдена линейная зависимость экспериментального флуоресцентного ратиометрического сигнала при увеличении температуры в диапазоне 283–353 К, и она подтверждена моделированием. При моделировании найдены основные механизмы, ответственные за температурную чувствительность флуоресцентного ратиометрического сигнала и найден диапазон pH его применимости.

3. Проанализирована зависимость спектральных характеристик флуоресцентной метки при ковалентном связывании с белками различного поверхностного заряда, путем оценки связи между экспериментальными и модельными параметрами.

Практическая значимость

Понимание механизмов, связывающих перенос протона с изменением спектральных характеристик водных растворов флуоресцеина, позволяет разрабатывать эффективные флуоресцентные сенсоры и маркеры для биологических исследований и важно для совершенствования методик визуализации биологических объектов и процессов.

Достоверность и обоснованность научных результатов

Достоверность и обоснованность научных результатов подтверждается корректным использованием автором современных представлений о методах экспериментальных исследований в области флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии, применением апробированных методик и паспортизированной аппаратуры; соответствием данных,

полученных автором экспериментально и математическим моделированием, а также с результатами других исследователей.

Основные результаты работы апробированы на международных и всероссийских научных форумах по тематике исследования. Материалы исследования в полной мере изложены в 13 печатных работах, включающих 5 статей в журналах из перечня ВАК и международных баз данных Web of Science и/или Scopus. Опубликовано 8 тезисов и докладов в сборниках международных и всероссийских конференций. По результатам исследования получены 2 свидетельства о гос. регистрации программы для ЭВМ.

Вопросы и замечания по диссертационному исследованию

1. В работе описан закон Бугера-Ламберта-Бера (стр. 13). Также в результативных главах проводится расчет оптической плотности на его основе в растворах флуоресцеина. Однако не обсуждается область применимости этого закона. Известно, что он верен только в приближении однократного рассеяния. В случае растворов красителей и биологических макромолекул рассеянием пренебречь нельзя.

2. В работе отмечается возможность достижения точности измерения (дисперсии) температуры по характеристикам ратиометрического сигнала флуоресцеина с полученных экспериментально 7 К до 2К. Хотелось бы подробного обсуждения в тексте путей снижения погрешностей измерения температуры локального окружения?

3. На рис. 16 (и других аналогичных) непонятно чем отличаются линии спектров? Ясно, что значением рН, но нет точных значений. Проводились ли измерения рН для этих растворов, либо о кислотности среды можно судить только качественно по концентрации добавленной в раствор серной кислоты?

4. Чем отличается радиационное время жизни и время флуоресценции? Какие физические процессы влияют на уменьшение времени флуоресценции относительно радиационного времени? Из приведенной в работе формулы (1.4) это не очевидно.

5. Не очевидно утверждение на стр. 16: "Повышенное значение анизотропии (флуоресценции) по сравнению со свободным сенсором в растворе сигнализирует об ограничении подвижности". Необходимо прокомментировать его и обосновать.

6. На стр. 23 утверждается, что длины волн могут быть выявлены путем построения разностных спектров и спектры поглощения составляют 488 нм для D и 435 нм для M форм флуоресцеина, однако выше абзацем написано, что это 453 нм для M (моноаниона). Почему такие различия? Хорошо бы также привести разностные спектры.

Незначительные замечания по оформлению

1. В тексте диссертационной работы присутствует некоторое количество орфографических ошибок и стилистических неточностей, незаконченных предложений, которые не влияют на восприятие текста по сути. Например, на стр. 62 в тексте «Главной причиной этого является поглощение одного набора ионных форм, а излучение другого, вследствие переноса протона в возбужденном состоянии» нужно «а» заменить на «и». Стили подписи к рисункам иногда отличаются (например, рис. 20 и 22). В предложении «Вероятность поглощения ионных форм красителя зависит от формы спектра поглощения или сечения поглощения» на стр. 34 необходимо заменить слово «зависят» на «характеризуются». На стр. 48 необходимо исправить «в близи» на «вблизи». На странице 14 не указана размерность времени жизни уровней.

2. В работе используются физические термины (квантовая эффективность возбуждаемого излучения размерностью $1/(с \cdot см^2)$ на стр. 13, оптическая плотность на стр. 13, радиационное время жизни на стр. 14), а их физический смысл не обсуждается, хотя следует отметить, что данные термины специфичны и обсуждение их физического смысла было бы полезно.

3. В главе 3 указываются температуры в Кельвинах. Лучше указать дополнительно соответствующий диапазон температур в шкале Цельсия для большего удобства восприятия, хотя перевод из одной шкалы в другую, безусловно, не представляет трудностей.

4. В подписи к рисунку рис. 5 нет ссылки на источник, где взяты данные, хотя в тексте эта ссылка есть. Принято указывать такую ссылку в подписи к рисунку.

Заключение

Сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы и ее практическую значимость. Диссертация и автореферат оформлены в соответствии с установленными требованиями ВАК. Автореферат диссертации достаточно полной мере отражает содержание, представленной к защите работы.

Диссертационная работа соответствует следующим пунктам паспорта специальности 1.3.6. Оптика: П.7 – Излучение, поглощение и рассеяние света изолированными и взаимодействующими атомами, молекулами и ионами. Физические основы процессов люминесценции и спектроскопических методов исследования веществ. Поляризационные явления; П.12 – Исследования физических основ фотоэлектрических явлений, фотохимических и кинетических процессов в газах, плазме, конденсированных средах и в биофизических объектах. Исследования принципов регистрации излучения.

Диссертационная работа Суржиковой Дарьи Павловны «Влияние переноса протона в основном и возбужденном состояниях на люминесцентные свойства ионных форм флуоресцеина» является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, удовлетворяющей требованиям Положения о присуждении ученых степеней №842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемых к кандидатским диссертациям и паспорту специальности, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.6. Оптика.

Официальный оппонент:

Кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник
физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова»

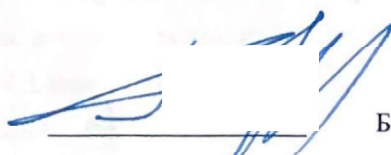
«2» июня 2025 г.



Луговцов А.Е.

Подпись Андрея Егоровича Луговцова удостоверяю.

И.о. декана
физического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова,
профессор, д.ф.-м.н.



Белокуров В.В.



Сведения об официальном оппоненте

Ф.И.О.: Луговцов Андрей Егорович;

Ученая степень и шифр специальности: кандидат физико-математических наук по специальности 01.04.21 - Лазерная физика;

Ученое звание: -;

Место работы: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», физический факультет;

Должность: Старший научный сотрудник;

Почтовый адрес: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2

Физический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова.

Список работ по теме диссертации за последние 5 лет (2021-2025):

1. Semenov, A.N. Erythrocytes membrane fluidity changes induced by adenylyl cyclase cascade activation: study using fluorescence recovery after photobleaching / A.N. Semenov, A.E. Lugovtsov, S.A. Rodionov, Eu.G. Maksimov, A.V. Priezzhev, E.A. Shirshin // Eur. Biophys. J. – 2024. – V. 53, No. 4. – P. 239-247.
DOI: 10.1007/s00249-024-01707-x.
2. Moldon, P.A. Influence of optical clearing agents on the scattering properties of human nail bed and blood microrheological properties: In vivo and in vitro study / P.A. Moldon, P.B. Ermolinskiy, A.E. Lugovtsov, P.A. Timoshina, E.N. Lazareva, Yu.I. Surkov, Y.I. Gurfinkel, V.V. Tuchin, A.V. Priezzhev // J. Biophotonics. – 2024. – P.e202300524
DOI 10.1002/jbio.202300524.
3. Semenov, A.N. Laser Aggregometry Assessment of Blood Microrheology in a Slit Fluidic Channel Covered With Endothelial Cells / A.N. Semenov, A.E. Lugovtsov, P.B. Ermolinskiy, A.V. Priezzhev // J. Biophotonics. – 2024. – V.17. – Is.12. –P.e202400379
DOI 10.1002/jbio.202400379.
4. Umerenkov, D.A. Assessment of Microcirculation and Microrheological Parameters of Blood in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus Using Biophotonics Techniques / D.A. Umerenkov,

- P.B. Ermolinskiy, A.E. Lugovtsov, A.A. Fabrichnova, Yu.I. Gurfinkel, L.I. Dyachuk, A.V. Priezzhev // J. Biophotonics. – 2024. – P.e202400485
DOI 10.1002/jbio.202400485.
5. Maksimov, M.K. RBC aggregation, deformation and adhesion to endothelium: Role of nitric oxide derived from L-Arginine and sodium nitroprusside / M.K. Maksimov, P.B. Ermolinskiy, O.N. Scheglovitova, N.N. Sklyankina, A.V. Muravyov, A.E. Lugovtsov, A.V. Priezzhev // J. Innov. Opt. Health Sci. – 2024. – V.17. – No.05. – №2440001
DOI 10.1142/s1793545824400017.
6. Ermolinskiy, P. Effect of Sodium Nitroprusside on the microrheological properties of red blood cells in different media / P. Ermolinskiy, M. Maksimov, A. Lugovtsov, A. Muravyov, I. Tikhomirova, A. Priezzhev // J. Innov. Opt. Health Sci. – 2024. – V.17. – No.05. – №2342001.
DOI 10.1142/s1793545823420014.
7. Ermolinskiy, P. Correlation between the Capillary Blood Flow Characteristics and Endothelium Function in Healthy Volunteers and Patients Suffering from Coronary Heart Disease and Atrial Fibrillation: A Pilot Study / P. Ermolinskiy, Yu. Gurfinkel, E. Sovetnikov, A. Lugovtsov, A. Priezzhev // Life. – 2023. – V.13. – No.10. – №2043.
DOI 10.3390/life13102043.
8. Semenov, A. Problems of Red Blood Cell Aggregation and Deformation Assessed by Laser Tweezers, Diffuse Light Scattering and Laser Diffractometry / A. Semenov, A. Lugovtsov, P. Ermolinskiy, A. Priezzhev, K. Lee // Photonics. – 2022. – V.9. – No.4. – №238
DOI 10.3390/photonics9040238.
9. Matskeplishvili, S. Use of biomedical photonics for in vivo and in vitro assessment of haemostasis and microcirculation in patients on antithrombotic therapy / S. Matskeplishvili, Y.U. Gurfinkel, L. Dyachuk, A. Lugovtsov, P. Ermolinskiy, A. Pigurenko, A. Priezzhev, S. Matskeplishvili // Eur. Heart J. – 2021. – V. 42. – ehab724.1282
DOI 10.1093/eurheartj/ehab724.1282.
10. Kapkov, A.A. Forces of RBC interaction with single endothelial cells in stationary conditions: Measurements with laser tweezers / A.A. Kapkov, P.B. Ermolinskiy, A.E. Lugovtsov, A.V. Priezzhev, A.N. Semenov // J. Innov. Opt. Health Sci. – 2021. – V.14. – No.5. – P. A377.
DOI 10.1142/S1793545821420050.
11. Perevedentseva, E. Raman spectroscopic study of TiO₂ nanoparticles' effects on the hemoglobin state in individual red blood cells / E. Perevedentseva, Y.C. Lin, A. Karmenyan K.T. Wu, C.L. Cheng,

A. Lugovtsov, E. Shirshin, A. Priezzhev // Materials. – 2021. – V.14. – No.20. – P. 5920.

DOI 10.3390/ma14205920.

12. Maslianitsyna, A. Multimodal diagnostics of microrheologic alterations in blood of coronary heart disease and diabetic patients / A. Maslianitsyna, P. Ermolinskiy, A. Lugovtsov, A. Priezzhev, A. Pigurenko, M. Sasonko, Y. Gurfinkel // Diagnostics. – 2021. – V.11. – No.1. – P. 76.

DOI 10.3390/diagnostics11010076.

Кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник
физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Московский государственный университет
имени М. В. Ломоносова»

«2» июня 2025 г.



Луговцов А.Е.

Подпись Андрея Егоровича Луговцова удостоверяю.

И.о. декана
физического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова,
профессор, д.ф.-м.н.




Белокуров В.В.