

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

Органический краситель флуоресцеин способен эффективно преобразовывать энергию фотовозбуждения в сине-зеленой области спектра в люминесценцию. Для биомедицинских применений важным является его водорастворимость, нетоксичность, возможность химической пришивки к белкам, не нарушающей их биологическую функцию. Все это сделало его одним из самых широко применяемых флуоресцентных маркеров.

Спектральные свойства органического люминофора чувствительны к реакциям с участием окружения, среди которых перенос протона играет важную роль. Диссертационная работа Суржиковой Д.П. посвящена всестороннему рассмотрению процессов переноса протона в основном и возбужденном состояниях флуоресцеина и их влиянию на спектральные и люминесцентные свойства его ионных форм в водных растворах в широком диапазоне pH. Работа направлена на развитие методов люминесцентного зондирования биологических сред, обеспечивающих высокое пространственное и временное разрешение.

Общая характеристика структуры и содержания работы

В диссертации Суржиковой Д.П. присутствуют все необходимые структурные элементы квалификационной работы.

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, показаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, сформулированы защищаемые положения.

В первой главе приведен обзор литературных источников, посвященных теме диссертационной работы, и даны основные определения используемым терминам. Проведенный анализ источников показывает актуальность выбранной темы и выделяет вопросы, требующие решения в рамках обозначенной проблемы.

Вх. № 287-03/6224/30
от 23.05.2025 г.

Во второй главе описаны объекты исследования, методика приготовления образцов, а также представлены экспериментальные установки. В данной главе представлена модель кинетических процессов для расчета населенности ионных форм флуоресцеина в основном и возбужденном состояниях при непрерывном фотовозбуждении в широком диапазоне pH. Описаны методики получения недостающих констант фотофизических процессов. Автором проведено моделирование населенности в широком диапазоне pH, которое позволило обнаружить «окна» pH, при которых преимущественно излучают ионные формы флуоресцеина. При найденных значениях pH, были измерены флуоресцентные характеристики ионных форм флуоресцеина.

В третьей главе описаны экспериментальные подходы и результаты моделирования для оценки влияния температуры в диапазоне 283÷353K на флуоресценцию водного раствора флуоресцеина при pH 6,0 и 6,5. Автор анализирует влияние четырех механизмов, среди которых изменение абсорбционных, излучательных характеристик и реакции протонирования/депротонирования в основном и возбужденном состояниях зонда. Два из них оказывают основное влияние на флуоресцентный сигнал – это смещение ионного равновесия в основном состоянии и температурное изменение формы спектра поглощения. Несмотря на многофакторность механизмов, влияющих на флуоресцентный ратиометрический сигнал, в эксперименте наблюдается линейная зависимость его величины от температуры и это полностью подтверждается результатами моделирования.

Четвертая глава посвящена экспериментальному исследованию спектрального отклика флуоресцентного зонда флуоресцеин-5-изотиоцианата (ФИТЦ), находящегося вблизи поверхности белков. Для этого были измерены и проанализированы спектральные сдвиги спектров поглощения, изменение ионного равновесия, флуоресцентный ратиометрический сигнал метки, специально конъюгированной с четырьмя различными белками. Проведен корреляционный анализ между экспериментальными результатами и расчетными параметрами белков (удельный заряд белка, площадь незаряженной части белка). Проведена оценка жесткости связи флуоресцентного зонда с белком, принимающая максимальное значение при выполнении условия их разного заряда.

Каждую главу завершает заключение с основными выводами. В общем заключении диссертационной работы сформулированы основные результаты и выводы,

полученные в ходе всего исследования. Список литературы содержит 157 наименований, полный объем текста – 121 страница.

Основные новые научные результаты

В диссертационной работе получен ряд новых научных результатов.

Смоделирован максимально общий с точки зрения диапазона кислотности окружения (рН 0÷10) случай распределения населенности основного и возбужденного состояния флуорофора под действием непрерывного возбуждающего излучения с учетом процессов диссоциации/ассоциации протонов с красителем. Методами стационарной и время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии найден ряд ранее неизвестных параметров (форма спектра испускания, время затухания флуоресценции, квантовый выход) ионных форм (катионная, хиноидная, моноанионная).

Выявлена линейная функциональная связь с температурой в диапазоне 283÷353К флуоресцентного безразмерного параметра, характеризующего ионное равновесие флуоресцеина (ратиометрического сигнала). На основе сравнения с модельными расчетами выявлен основной механизм, определяющий эту функциональную связь и количественно охарактеризована чувствительность метода определения и контроля локальной температуры по оптическим характеристикам зонда.

Выявлена зависимость спектральных свойств флуоресцеиновой метки на поверхности белков от свойств этой поверхности. Для выборки из четырех белков (лизоцима куриного белка, карбоксиангидразы Б быка II, бычьего сывороточного альбумина, бактериальной люциферазы из *Photobacterium leiognathi*) показана высокая корреляция величины ратиометрического сигнала метки с удельным зарядом поверхности белка, а величины красного сдвига максимума спектра поглощения – с площадью незаряженной части белка.

Практическая значимость

Результаты работы вносят вклад в понимание механизмов формирования флуоресцентного сигнала флуоресцеинового красителя в водных растворах в свободном состоянии и на поверхности белков. Это способствует увеличению информативности флуоресцентных методов зондирования функционально значимых биологических сред.

Достоверность и обоснованность научных результатов

Достоверность и обоснованность результатов диссертационной работы обуславливается применением принятых для данной тематической области методик

измерения спектральных характеристик с использованием современных спектральных приборов, соответствием экспериментальных результатов представлениям, развитым в теоретических работах автора и опубликованным в научной литературе.

Основные результаты проведенного исследования отражены в 13 публикациях, в том числе 5 статей в журналах, включенных в список ВАК Министерства науки и высшего образования РФ и 8 в сборниках тезисов и докладов конференций. В ходе работы получены 2 свидетельства о гос. регистрации программы для ЭВМ. Результаты научной работы Суржиковой Д.П. широко представлены на международных и всероссийских тематических научных конференциях.

Вопросы и замечания по работе

1. Корректность использования автором термина «флуоресцентное время жизни». Принятым в классической литературе (Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии – М.: Мир, 1986. – 496 с.) является термин «время затухания флуоресценции».
2. Как в моделировании процесса переноса протона к красителю и его ассоциации с ним учитывается концентрация протонов?
3. Какая выборка использована в работе? Каким образом вычислялась ошибка измерений?
4. Какие приближения использованы при формализации задачи с помощью системы представленных кинетических уравнений? Насколько они соответствуют изучаемой ситуации?

Высказанные вопросы направлены на прояснение деталей выполненной работы, а также на обсуждение возможных перспектив ее развития. Оформление, стиль и глубина изложения материала диссертации говорят о высоком профессиональном уровне диссертанта.

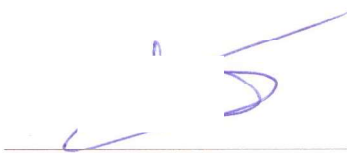
Заключение

Диссертационная работа Суржиковой Дарьи Павловны «Влияние переноса протона в основном и возбужденном состояниях на люминесцентные свойства ионных форм флуоресцеина» представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, выполненным на актуальную тему, обладает научной новизной и практической значимостью и свидетельствует о личном вкладе автора в науку. Автореферат отражает содержание диссертации. Диссертационная работа соответствует паспорту научной

специальности 1.3.6. Оптика по физико-математической отрасли наук и требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года, № 842. Ее автор, Суржикова Дарья Павловна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.6. Оптика.

Доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией лазерного молекулярного имиджинга и машинного обучения Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

«23» мая 2025 г.



Кистенев Ю.В.

Подпись Ю.В. Кистенева удостоверяю:

ученый секретарь Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

канд. геол.-минерал. наук



Бухарова О.В.

Сведения об официальном оппоненте

Ф.И.О.: Кистенев Юрий Владимирович;

Ученая степень и шифр специальности: доктор физико-математических наук по специальности 01.04.05 – Оптика;

Ученое звание: Профессор;

Место работы: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», лаборатория лазерного молекулярного имиджинга и машинного обучения;

Должность: Заведующий лабораторией;

Почтовый адрес: 634050, г. Томск, проспект Ленина, 36, Национальный исследовательский Томский государственный университет.

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

1. Nikolaev, V.V. Quantum Dot-Based Nanosensors for In Vitro Detection of Mycobacterium tuberculosis / V.V. Nikolaev, T.B. Lepekhina, A.S. Alliluev, E. Bidram, P.M. Sokolov, I.R. Nabiev, Yu.V. Kistenev // Nanomaterials. – 2024. – V.14. – Is.19. – P. 1553.
DOI: 10.3390/nano14191553
2. Raju, G. Exploring the future of regenerative medicine: unveiling the potential of optical microscopy for structural and functional imaging of stem cells / G. Raju, S. Nayak, N. Acharya, M. Sunder, Yu. Kistenev, N. Mazumder // J. Biophotonics. – 2024. – V.17. – Is.1. – P. e202300360. DOI: 10.1002/jbio.202300360
3. Zuhayri, H. The Quantitative *In Vivo* Assessment of Diabetic and Non-Diabetic Skin Wound Healing Using Phasor-FLIM Approach / H. Zuhayri, T.B. Lepekhina, V.V. Nikolaev, H. Baalbaki, A.I. Knyazkova, A.V. Borisov, N.A. Krivova, Yu.V. Kistenev // J. Biophotonics. – 2024. – P. e202400227. DOI: 10.1002/jbio.202400227
4. Knyazkova A.I., Quantitative assessment of the hydrate shell thickness of lactose monohydrate molecules in aqueous solutions / A.I. Knyazkova, M.S. Snegerev, A.P. Votintsev, V.V. Nikolaev, D.A. Vrazhnov, Yu.V. Kistenev // Russ. J. Phys. Chem. A. – 2024. – V. 98. – P. 1140-1146. DOI: 10.1134/S0036024424700067

5. Lepekhina, T.B. Two-Photon-Excited FLIM of NAD(P)H and FAD—Metabolic Activity of Fibroblasts for the Diagnostics of Osteoimplant Survival / T.B. Lepekhina, V.V. Nikolaev, M.E. Darvin, H. Zuhayri, M.S. Snegerev, A.S. Lozhkomoev, E.I. Senkina, A.P. Kokhanenko, K.A. Lozovoy, Yu.V. Kistenev // Int. J. Mol. Sci. – 2024. – V.25. – Is.4. – P. 2257.
DOI: 10.3390/ijms25042257
6. Nikolaev V.V., Estimating the Porosity of Nickel-Titanium (NiTi) Implants Using Optical Coherence Tomography and Machine Learning / V.V. Nikolaev, T.B. Lepekhina, G.V. Malkin, A.S. Garin, E.S. Marchenko, A.V. Dubrov, M.D. Khomenko, Yu. Kistenev // J. Biomed. Photonics Eng. – 2024. – V.10. – Is.4. – P. 040310. DOI: 10.18287/jbpe24.10.040310
7. Knyazkova, A.I. Study of the Effect of Formaldehyde Fixation on Collagen Optical Properties in the Terahertz Frequency Range / A.I. Knyazkova, O.D. Kuzminykh, Yu.V. Kistenev, A.V. Borisov // J. Biomed. Photonics Eng. – 2024. – V.10. – Is.4. – P. 040306.
DOI: 10.18287/jbpe24.10.040306
8. Kistenev, Yu.V. Diabetes noninvasive diagnostics and monitoring through volatile biomarkers analysis in the exhaled breath using optical absorption spectroscopy / Yu.V. Kistenev, A.V. Borisov, V.S. Zasedatel, L.V. Spirina // J. Biophotonics. – 2023. – V.16. – Is.12. – P. e202300198. DOI: 10.1002/jbio.202300198
9. Kupriyanov, V. Implementation of data fusion to increase the efficiency of classification of precancerous skin states using in vivo bimodal spectroscopic technique / V. Kupriyanov, W. Blondel, Ch. Daul, M. Amouroux, Yu. Kistenev // J. Biophotonics. – 2023. – V.16. – Is.7. – P. e202300035. DOI: 10.1002/jbio.202300035
10. Zhang, Yu. Metal-organic frameworks based surface-enhanced Raman spectroscopy technique for ultra-sensitive biomedical trace detection / Yu. Zhang, C. Xue, Yu. Xu, Sh. Cui, A.A. Ganeev, Yu.V. Kistenev, A. Gubal, V. Chuchina, H. Jin, D. Cui // Nano Research – 2023. – V.16. – Is.2. – P. 2968-2979. DOI: 10.1007/s12274-022-4914-1
11. Vrazhnov D. Discovering glioma tissue through its biomarkers' detection in blood by Raman spectroscopy and machine learning / D. Vrazhnov, A. Mankova, E. Stupak, Yu. Kistenev, A. Shkurinov, O. Cherkasova // Pharmaceutics. – 2023. – V.15. – Is.1. – P. 203.
DOI: 10.3390/pharmaceutics15010203
12. Knyaz'kova, A.I. Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy of Rat Elastin Fiber *In Vivo* / A.I. Knyaz'kova, A.A. Samarinova, V.V. Nikolaev, Yu.V. Kistenev, A.V. Borisov // Russ. Phys. J. – 2022. – V.64. – P.2123-2128. DOI: 10.1007/s11182-022-02565-w

13. Yanina, I.Y. Measurement and Modeling of the Optical Properties of Adipose Tissue in the Terahertz Range: Aspects of Disease Diagnosis / I.Y. Yanina, V.V. Nikolaev, O.A. Zakharova, A.V. Borisov, K.N. Dvoretzkiy, K.V. Berezin, V.I. Kochubey, Yu.V. Kistenev, V.V. Tuchin // Diagnostics. – 2022 – V.12. – Is.10. – P. 2395.

DOI: 10.3390/diagnostics12102395

14. Konnikova, M.R. Malignant and benign thyroid nodule differentiation through the analysis of blood plasma with terahertz spectroscopy / M.R. Konnikova, O.P. Cherkasova, M.M. Nazarov, D.A. Vrazhnov, Yu.V. Kistenev, S.E. Titov, E.V. Kopeikina, S.P. Shevchenko, A.P. Shkurinov // Biomed. Opt. Express. – 2021. – V.12. – Is.2. – P.1020-1035.

DOI: 10.1364/BOE.412715

Доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией лазерного молекулярного имиджинга и машинного обучения Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

«23» мая 2025 г.



Кистенев Ю.В.

Подпись Ю.В. Кистенева удостоверяю:

ученый секретарь Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

канд. геол.-минерал. наук



Бухарова О.В.