

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Смитиенко Ольги Александровны на тему: «Фотохромные реакции ретинальсодержащих белков – зрительного родопсина и бактериородопсина – в фемто- и пикосекундном диапазоне времен», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.2. Биофизика.

Актуальность работы. Диссертационная работа Смитиенко О.А. посвящена проблемам, которые имеют глубокую фундаментальную основу и всегда будут вызывать интерес исследователей. Я имею в виду механизм работы ретинальсодержащих белков (родопсинов) в составе природных пигментных систем. Эти системы, с одной стороны, ответственны за зрение человека и животных (родопсины 2 типа). Причем в случае нашего вида через зрение мы получаем около 90% информации об окружающей среде. С другой стороны, на протонных насосах архей, бактерий и низших эукариот (родопсины 1 типа) основана древнейшая биологическая система запасания солнечной энергии, возможно, самая древняя система фотосинтеза на нашей планете, которой не менее 3-х млрд лет. Конечно, этим системам посвящено множество работ. Интригующим является вопрос о том, связаны ли эти два типа родопсинов между собой в эволюционном отношении? Однозначный ответ на этот вопрос пока не получен. Перед диссертантом были поставлены сложные задачи – исследование и сравнение динамики прямой и обратной фотореакции зрительного родопсина (родопсин 2 типа) и бактериородопсина (родопсин 1 типа) в фемто- и пикосекундном временном диапазоне. Для решения этих задач была использована суперсовременная фемтосекундная лазерная установка, одна из немногих в мире. Таким образом, постановка задачи актуальна как с теоретической, так и с технической точки зрения.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 142 страницах, содержит 5 таблиц и 46 иллюстраций. Библиографический указатель включает 268 источников по 2021 г. Работа состоит из следующих разделов: оглавление, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы, благодарности, список сокращений и условных обозначений, список терминов и список литературы.

Литературный обзор (**Глава 1**) изложен на 32 страницах. Первая часть обзора посвящена зрительному родопсину, его структуре и функции, спектральным свойствам, процессу фотолиза, первичным фотохимическим превращениям и их моделированию. Вторая часть посвящена бактериородопсину, его структуре и фотоциклу. Третья часть посвящена фотохромизму родопсинов 1 и 2 типа.

Автор затрагивает и некоторые важные смежные вопросы. Отмечено, что зрительные родопсины 2 типа в большинстве случаев представляют собой специализированные G-белок-связывающие рецепторы животных, которые обеспечивают в основном фотоинформационные функции, основная из которых – зрительная. Существуют и незрительные родопсины, функции которых связаны с циркадными ритмами, сужением зрачка, загаром, сезонным размножением и др.

Родопсины 1 типа весьма разнообразны по выполняемым функциям и представляют собой регулируемые светом ионные каналы и насосы, а также фотосенсоры. Автор упоминает также оптогенетику как метод регуляции светом ионных каналов, встроенных в клетки мозга. Обзор достаточен для целей диссертации.

Глава 2 изложена на 14 страницах и посвящена описанию материалов и методов. Из этого раздела следует, что автор овладел биохимическими методиками, необходимыми для работы: методикой выделения наружных сегментов палочек сетчатки из глаз быка; приготовлением дисков фоторецепторных мембран; приготовлением детергентных экстрактов родопсина; методом стационарной абсорбционной спектроскопии в видимой и УФ области. Центральным, конечно, является метод фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии. Данные, представленные в работе, были получены на экспериментальной установке, созданной в лаборатории био- и нанопотоники ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семенова РАН. Эта установка хорошо известна специалистам и является одной из лучших фемтосекундных установок, применяемых сегодня в России для биологических целей. Установка сложна технически, непосредственные измерения на ней выполнялись совместно с сотрудниками лаборатории био- и нанопотоники с использованием образцов диссертанта. Диссертант детально ознакомился со схемой прибора, схемами возбуждения и измерения, а также с достаточно сложной методикой обработки данных, что следует из приведенных технических параметров, схем, рисунков, математических формул и алгоритмов обработки данных.

В **Главах 3 и 4**, изложенных на 60 страницах, приведены результаты изучения фотореакций зрительного родопсина и бактериородопсина при фотовозбуждении в фемтосекундном временном диапазоне, а также приведено их обсуждение. Из наиболее важных результатов можно выделить следующие. Автору удалось надежно зарегистрировать промежуточные состояния родопсинов 1 и 2 типа, образование которых индуцировано поглощением кванта света. В случае зрительного родопсина были экспериментально выделены полосы дифференциального поглощения, соответствующие образованию первичного возбужденного состояния P_{510} за время 30 фс, первого фотопродукта $Photo_{570}$ с изомеризованным ретиналем (ретиналь перешел из 11-цис в полностью-транс форму) ко времени 200 фс и второго фотопродукта $Bato_{535}$

за время 2,2 пс. При фотовозбуждении продукта Фото₅₇₀ красным лазерным импульсом процесс шел в обратную сторону с регенерацией 11-*цис* ретиналя. Впервые исследованы кинетические особенности этой обратной фотореакции и определен ее квантовый выход. Обратимость наблюдалась также при фотовозбуждении продукта Бато₅₃₅. Аналогичные данные были получены при исследовании бактериородопсина. В процессе исследования прямой фотореакции наблюдалось образование первичных продуктов, J_{625} и K_{590} , и были определены времена этих процессов. Впервые показана возможность индуцирования обратной фотореакции бактериородопсина на временах 1–5 пс из первичных продуктов прямой фотореакции этого белка и рассчитан ее квантовый выход. Сравнение фотохромных реакций двух исследованных белков показало, что ярко выраженный когерентный характер прямой фотореакции и низкий квантовый выход обратной фотореакции зрительного родопсина повышают надежность его работы как фоторецептора, что крайне важно для высокой светочувствительности зрительного аппарата животных.

Завершают работу **заключение и выводы**, которые соответствуют основным целям и задачам исследования и отражают полученные автором результаты.

Теоретическая и практическая значимость работы связана с тем, что данные, полученные в работе, позволяют глубже понять механизм преобразования света, осуществляемый родопсинами, и могут быть использованы в оптогенетике.

Материалы, представленные в диссертации, прошли апробацию на 6 российских и международных научных конференциях и достаточно полно отражены в 6 статьях (5 публикациях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, и 1 публикации в книге, индексируемой в базе Scopus). Автореферат отражает основное содержание работы.

По содержанию и оформлению диссертационной работы есть несколько **замечаний**. (1) Часть обзора, посвященная незрительным родопсинам и оптогенетике, слишком лаконична. Если бы автор посвятил этим проблемам еще 2-3 страницы, ценность обзора и всей работы в целом была бы больше. (2) Неудачно сформулированы положения, вынесенные на защиту, они слишком общие и мало соответствуют работе. (3) Есть мелкие опечатки, например, во многих случаях не поставлен знак умножения, как, например, $(0,9 \pm 0,3) 10^{-5}$ (стр. 23). (4) Обращает на себя внимание, что совсем не рассмотрен вопрос об образовании и возможной роли триплетного состояния ретиналя в родопсине. Мы обсудили этот вопрос с диссертантом, действительно эта проблема не обсуждается в современных обзорных работах. Мое пожелание состоит в том, чтобы в

будущем какое-то суждение об этом было автором высказано.

Диссертационная работа Смитиенко Ольги Александровны «Фотохромные реакции ретиналь-содержащих белков – зрительного родопсина и бактериородопсина – в фемто- и пикосекундном диапазоне времен» представляет собой законченную научно-квалификационную работу и удовлетворяет всем требованиям, установленным пунктами 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства России от 24 сентября 2013 года № 842 в редакции с изменениями, утвержденными Постановлениями Правительства РФ от 21 апреля 2016 года № 335, от 01 октября 2018 года № 1168 и от 20 марта 2021 года № 426.

Смитиенко Ольга Александровна заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук по
специальности 1.5.2. Биофизика,
профессор,



подпись

Красновский Александр Александрович

29.02.2022

дата

Место работы: Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН), Институт биохимии им. А.Н. Баха

Должность: главный научный сотрудник лаборатории физической биохимии
Почтовый адрес: 119071, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 33 к. 2
E-mail: phoal@mail.ru
Тел. +7(903) 749 8648

Подпись и сведения Красновского Александра Александровича удостоверяю

Федерального бюджетного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

к.б.н.
Тел.: 8 (495) 954-40-07; e-mail: Orlovsky@inbi.ras.ru

Орловский Александр Федорович

