

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.038.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА
БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ ИМ. Н.М. ЭМАНУЭЛЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ
СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 16 марта 2022 года № 2

О присуждении Смитиенко Ольге Александровне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Фотохромные реакции ретинальсодержащих белков – зрительного родопсина и бактериородопсина – в фемто- и пикосекундном диапазоне времен» по специальности 1.5.2. Биофизика принята к защите 22 декабря 2021 года (протокол заседания №9) диссертационным советом 24.1.038.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, по адресу: 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4; приказ Министерства образования и науки №105/нк от 11 апреля 2012 года.

Соискатель – Смитиенко Ольга Александровна, 25 апреля 1980 года рождения, в 2002 году окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по специальности «биофизика». С 1 ноября 2003 года по 1 ноября 2006 года обучалась в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по специальности 03.01.02. – биофизика (1.5.2. Биофизика). С 2001 года по настоящее время работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля

Российской академии наук в лаборатории физико-химических основ рецепции в должности научного сотрудника.

Диссертация выполнена в лаборатории физико-химических основ рецепции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор, академик Российской академии наук **Островский Михаил Аркадьевич**, главный научный сотрудник и по совместительству заведующий лабораторией физико-химических основ рецепции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Красновский Александр Александрович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории физической биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»;

Борщевский Валентин Иванович, кандидат физико-математических наук, заместитель директора Центра исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» (МФТИ)

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук» в своем положительном заключении, составленном заместителем руководителя Центра фотохимии РАН ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, доцентом, кандидатом физико-

математических наук Петровым Николаем Христофоровичем и утвержденном директором ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, кандидатом физико-математических наук Алексеевой Ольгой Анатольевной, указывает, что диссертация, несомненно, является актуальной, поскольку направлена на изучение сверхбыстрых фотохромных реакций двух наиболее типичных представителей родопсинов 1 и 2 типа, протонного насоса бактериородопсина археи *H. salinarum* и зрительного родопсина быка *B. taurus*, соответственно. В отзыве подчеркнута, что в результате проведенной работы автором получены кинетические характеристики образования первичных продуктов и интермедиатов прямой фотореакции исследуемых белков; впервые показана возможность инициирования обратной фотореакции бактериородопсина в раннем пикосекундном временном диапазоне из первичных продуктов прямой фотореакции; проведено сравнение динамики и механизма фотохромных реакций зрительного родопсина и бактериородопсина. Полученные результаты и их интерпретация соответствуют современным научным представлениям о закономерностях физико-химических процессов в светочувствительных белках.

В заключении отмечается, что диссертационная работа Смитиенко О.А. на тему «Фотохромные реакции ретинальсодержащих белков – зрительного родопсина и бактериородопсина – в фемто- и пикосекундном диапазоне времен» представляет собой законченную научно-квалификационную работу и удовлетворяет требованиям, установленным пунктами 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства России № 842 от 24 сентября 2013 года в редакции с изменениями, утвержденными Постановлениями Правительства РФ № 335 от 21 апреля 2016 года, № 1168 от 01 октября 2018 года и № 426 от 20 марта 2021 года, а ее автор заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Соискатель имеет 32 опубликованных работы, в том числе по теме диссертации опубликовано 12 работ, из них 5 статей в рецензируемых

научных российских и международных научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 1 глава в книге, индексируемой в базе Scopus, и 6 тезисов докладов в сборниках тезисов российских и международных конференций.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

- 1) **Smitienko, O. A.** Comparative femtosecond spectroscopy of primary photoreactions of *Exiguobacterium sibiricum* rhodopsin and *Halobacterium salinarum* bacteriorhodopsin / O. A. Smitienko, T. B. Feldman, L. E. Petrovskaya, O. V. Nekrasova, M. A. Yakovleva, I. V. Shelaev, F. E. Gostev, D. A. Cherepanov, I. B. Kolchugina, D. A. Dolgikh, V. A. Nadtochenko, M. P. Kirpichnikov, M. A. Ostrovsky // **J. Phys. Chem. B.** – 2021. – V. 125. – P. 995–1008.
- 2) Feldman, T. B. Femtosecond spectroscopic study of photochromic reactions of bacteriorhodopsin and visual rhodopsin / T. B. Feldman, **O. A. Smitienko**, I. V. Shelaev, F. E. Gostev, O. V. Nekrasova, D. A. Dolgikh, V. A. Nadtochenko, M. P. Kirpichnikov, M. A. Ostrovsky // **J. Photochem. Photobiol. B.** – 2016. – V. 164. – P. 296–305.
- 3) **Smitienko, O.** Femtosecond laser spectroscopy of the rhodopsin photochromic reaction: a concept for ultrafast optical molecular switch creation (ultrafast reversible photoreaction of rhodopsin) / O. Smitienko, V. Nadtochenko, T. Feldman, M. Balatskaya, I. Shelaev, F. Gostev, O. Sarkisov, M. Ostrovsky // **Molecules.** – 2014. – V. 19. – P. 18351–18366.

На автореферат поступило 4 положительных отзыва: 1. отзыв д.б.н., профессора, заслуженного деятеля науки РФ **Артюхова Валерия Григорьевича**, заведующего кафедрой биофизики и биотехнологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», и д.б.н., доцента **Путинцевой Ольги Васильевны**, профессора кафедры биофизики и биотехнологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»; 2. отзыв д.х.н., профессора **Шилова Владимира Петровича**, главного научного сотрудника лаборатории химии трансурановых элементов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института

физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук; **3.** отзыв к.б.н. **Забелина Алексея Александровича**, старшего научного сотрудника лаборатории первичных процессов фотосинтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук; **4.** отзыв к.б.н. **Ивановой Ольги Николаевны**, старшего научного сотрудника лаборатории биохимии вирусных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук. Все отзывы без замечаний.

В отзывах отмечено, что тема диссертации является актуальной, соискатель на примере зрительного родопсина и бактериородопсина не только подтвердил и расширил данные о первичных реакциях ретинальсодержащих белков, накопленные в литературе, но и получил новые экспериментальные данные, которые подробно описывают динамику прямой фотореакции зрительного родопсина и бактериородопсина в фемто- и пикосекундном диапазоне времен. Применение соискателем оригинального методического подхода «возбуждение-возбуждение-зондирование» в рамках метода фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии открыло дополнительные возможности для изучения обратных фотореакций родопсинов. Автор корректно использует известные современные биохимические и физико-химические методы для получения и анализа результатов. Все сделанные выводы обоснованы и соответствуют полученным результатам.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их специализацией по проблеме настоящей диссертационной работы и достижениями в области биофизики белков, в том числе ретинальсодержащих, фотобиологии и время-разрешенной лазерной спектроскопии органических молекул, а также наличием публикаций в соответствующей сфере исследования, что позволяет им оценить научную и практическую значимость диссертации. Оппонент д.б.н., профессор

Красновский А.А. является ведущим специалистом в области биофизики и фотоники пигментных фоторецепторных систем. Оппонент к.ф.-м.н. Борщевский В.И. является ведущим специалистом в области исследования структурных основ функционирования микробиальных родопсинов и родопсинов животных, а также других G-белок-связывающих рецепторов. Ведущая организация – Федеральное государственное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук» является ведущим центром в области изучения фотоники и фотохимии молекулярных и супрамолекулярных систем, в том числе фотохромных органических молекул.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

предложена кинетическая схема, описывающая первичные фотоактивируемые процессы как зрительного родопсина, так и бактериородопсина, которая включает прямую реакцию фотоизомеризации ретиналя и процессы, не ведущие к фотоизомеризации;

доказана способность двух представителей родопсинов 1 и 2 типа к фотохромизму в фемто- и раннем пикосекундном диапазоне времен, а именно, к фотопереходу из первичных продуктов прямой фотореакции в исходное состояние белка без образования побочных продуктов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что: на основе сравнительного анализа фотохромной реакции зрительного родопсина и бактериородопсина **предложена** оригинальная научная гипотеза, заключающаяся в том, что низкий квантовый выход обратной фотореакции зрительного родопсина по сравнению с бактериородопсином, наряду с ярко выраженным когерентным характером и высокой скоростью прямой фотореакции, повышает эффективность осуществления основной физиологической функции этого белка – инициации процесса фототрансдукции;

применительно к проблематике диссертации результативно использованы методы исследования светочувствительных белков, такие как стационарная спектрофотометрия и фемтосекундная абсорбционная лазерная спектроскопия;

изложены экспериментальные данные, которые подтверждают модель, используемую в литературе для описания первичных реакций родопсинов, в рамках которой фотоизомеризация ретиналя протекает в возбужденном электронном состоянии путем перехода в основное электронное состояние через область конического пересечения S_1/S_0 поверхностей потенциальной энергии;

изучены первичные реакции зрительного родопсина и бактериородопсина, которые протекают с образованием аналогичных по своим свойствам интермедиатов, при этом скорости образования первичного продукта значительно различаются, что обусловлено разными изомерными формами их хромофоров и хромофор-белковыми взаимодействиями.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

определены времена протекания прямой фотореакции исследуемых белков и время протекания обратной фотореакции зрительного родопсина, индуцированной из первого продукта прямой фотореакции фотородопсина;

рассчитан квантовый выход обратных фотореакций исследуемых белков;

установлена прямая связь между эффективностью обратных фотореакций и когерентными эффектами прямых фотореакций исследуемых белков;

представлен метод для изучения механизма фотореакции ретинальсодержащих белков путем индуцирования фотохромных переходов на ранних временах.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ результаты получены на сертифицированном оборудовании с применением современных биохимических и биофизических методов исследования, стандартных

методик обработки результатов; показана воспроизводимость результатов; сформулированные в диссертации научные положения и выводы достоверны и полностью подтверждаются экспериментальными данными;

теория основывается на известных литературных данных о динамике процессов, активируемых в родопсинах при поглощении кванта света, и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

идея базируется на обобщении данных по изучению механизма фотохромной реакции изомеризации ретиналя в газовой фазе, растворе и белковом окружении;

использованы авторские данные и данные, полученные и опубликованные другими исследователями, по рассматриваемой тематике;

установлено соответствие авторских результатов результатам, представленным в независимых источниках по первичным реакциям ретинальсодержащих белков;

использованы современные методики сбора, статистической обработки и анализа полученных данных и построения графиков, в том числе программа Span, написанная в программно-языковой среде Matlab (*Hardware: Belousov, Vezakov*), а также программы Origin и Igor Pro.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах работы, в том числе в анализе литературных данных, планировании, подготовке и проведении научных экспериментов, обработке полученных результатов с помощью специализированного программного обеспечения и их интерпретации, апробации результатов исследования на конференциях и семинарах, а также подготовке публикаций по результатам работы.

В ходе защиты диссертации были заданы вопросы и высказаны следующие критические замечания:

1. **Каламкар Г.Р.:** Родопсин в палочках работает при крайне низких освещенностях. Случайное индуцирование обратной фотореакции за

фемтосекунды крайне маловероятно. Так какой может быть физиологический смысл обратной фотореакции на столь коротких временах, о котором вы говорите?

2. **Цаплев Ю.Б.:** На слайде со схемой сечения поверхностей потенциальной энергии бактериородопсина показано близкое расположение S_1 и S_2 поверхностей, что, на мой взгляд, невозможно, поскольку возбужденное состояние I_{460} , возникающее в этой области, поглощает с максимумом 460 нм.

Соискатель Смитиенко О.А. ответила на заданные вопросы и привела собственную аргументацию по критическим замечаниям:

1. Это действительно предположение, которое мы сделали в нашей работе, подтвержденное данными, полученными методом низкотемпературной спектрофотометрии, которые свидетельствуют о похожем соотношении квантовых выходов обратных фотореакций зрительного родопсина и бактериородопсина, индуцированных из более поздних продуктов.
2. Существует много квантово-химических расчетов, которые показывают, что S_2 поверхность потенциальной энергии очень близко подходит к S_1 поверхности, а длина волны 460 нм соответствует максимуму поглощения из S_1 состояния на более высоко лежащие S_n уровни.

Диссертация Смитиенко О.А. «Фотохромные реакции ретинальсодержащих белков – зрительного родопсина и бактериородопсина – в фемто- и пикосекундном диапазоне времен» представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, удовлетворяющую требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, изложенным в пунктах 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 года в редакции с изменениями, утвержденными Постановлениями Правительства РФ № 335 от 21 апреля 2016 года, № 1168 от 01 октября 2018 года и № 426 от 20 марта 2021 года.

На заседании 16 марта 2022 года диссертационный совет принял решение: за исследование сверхбыстрой фотохромной когерентной реакции изомеризации хромофора в зрительном родопсине и бактериородопсине методом фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии, имеющее значение для развития биофизики ретинальсодержащих белков, присудить Смитиенко Ольге Александровне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человек, из них 7 докторов наук по специальности 1.5.2. Биофизика, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени – 20, против присуждения ученой степени – 0, недействительных бюллетеней – 1.

Председатель

диссертационного совета, д.х.н.



Трофимов А.В.

Ученый секретарь

диссертационного совета, к.х.н.

Мазалецкая Л.И.

16 марта 2022 г.