

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Бойковой Анастасии Сергеевны  
«Формирование тонкопленочных упорядоченных белковых структур из  
полидисперсных кристаллизационных растворов лизоцима»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата физико-  
математических наук по специальности  
01.04.07 – «Физика конденсированного состояния»

Диссертационная работа Бойковой Анастасии Сергеевны посвящена разработке метода формирования тонкопленочных упорядоченных белковых структур на основе ленгмюровской технологии из полидисперсных растворов лизоцима и изучению структурных особенностей полученных пленок. В работе был предложен и применен ранее не использованный подход к получению белковых пленок на основе ленгмюровской технологии, основанный на формировании белковых пленок из полидисперсного раствора с участием белковых олигомеров – элементов структуры кристалла белка.

В работе впервые были получены ленгмюровские слои лизоцима на поверхности жидкости и кремневых подложках, сформированные из полидисперсных растворов, содержащих олигомерные частицы лизоцима, образованные в условиях кристаллизации при добавлении осадителя. Изучение структуры пленок было проведено с помощью методов рентгеновской рефлектометрии и стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения. Было показано, что слои лизоцима, формируемые из кристаллизационного раствора (т.е. из раствора белка с добавлением осадителя), имеют толщину, сопоставимую с размером предкристаллизационного кластера лизоцима - октамера.

Актуальность работы заключается, прежде всего, в том, что использование белковых пленок при конструировании, например, биосенсорных устройств на их основе для нужд биомедицины и мониторинга экологической обстановки, осложнено ввиду сложности их получения. Белки – это органические молекулы со сложной структурной организацией, которая чрезвычайно зависима от внешних условий. Ввиду этого разработка способа получения стабильных белковых пленок является важной задачей. Получение планарных белковых гибридных систем, представляющих собой ансамбли биомолекул в виде двумерной структуры на твердых поверхностях, является важной задачей для конструирования сенсорных систем, обладающих специфической чувствительностью, свойственной молекулам белков и ферментов. В связи с этим возникает задача, касающаяся поиска наиболее эффективных методов получения упорядоченных белковых планарных структур и способов осаждения такой системы на твердые подложки.

Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов и списка цитируемой литературы. Объем диссертации составляет 137 страниц, включая 48 рисунков, 2 таблицы и список литературы из 180 наименований.

**Во введении** диссертации содержится обоснование актуальности проводимых исследований, и излагаются цели диссертационной работы. Отмечены новизна и практическая значимость работы, представлены сведения об апробации результатов и публикациях.

**В главе 1** представлен литературный обзор, посвященный методам получения белковых пленок и методам структурных исследований слоевых органических ансамблей и приповерхностных слоев. Подробно описывается метод рентгеновской рефлектометрии с использованием источников синхротронного излучения, метод стоячих волн в области полного внешнего отражения, малоугловое рассеяние в скользящих углах падения, приводятся преимущества и недостатки указанных методов. Кроме того, автор подробно излагает результаты ранее проведенных исследований растворов модельного белка лизоцима с помощью методов малоуглового рассеяния рентгеновского излучения и нейтронов, а также структурные исследования пленок лизоцима с помощью рентгеновского и синхротронного излучения.

**В главе 2** представлена методическая часть работы. Подробно описаны способы получения белковых пленок на твердых подложках и на поверхности жидкости в ленгмюровской ванне. Представлены применяемые в работе методы исследования структуры органических пленок и белковых растворов (рентгеновской рефлектометрии, стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения, методы малоуглового рассеяния рентгеновского излучения, атомно-силовой микроскопии). Также автор дает детальное описание условий получения всех исследованных образцов (белковых, буферных, солевых растворов, пленок и др.) и описывает используемые в работе установки, перечисляя параметры их работы, местоположение и др.

**Глава 3** посвящена получению и исследованию пленок белка лизоцима на твердых подложках, сформированных с помощью модифицированного метода Ленгмюра-Шеффера из монодисперсного и полидисперсного растворов с добавлением осадителя хлорида натрия. Параметры кристаллизационного раствора, в котором при добавлении осадителя образовывались олигомеры, соответствовали условиям роста кристалла лизоцима тетрагональной сингонии. Методами рентгеновской рефлектометрии и атомно-силовой микроскопии было показано, что толщина пленки, сформированной из полидисперсного раствора, соответствует диаметру октамеров. Формирование белковой пленки заканчивается приблизительно через 20 часов после переноса ее с поверхности водной субфазы на подложку. Важным результатом является то, что электронная плотность и однородность пленок, полученных предложенным способом, существенно выше, чем пленок лизоцима, полученных «традиционным» способом из раствора белка, содержащего только мономеры.

Одновременно с регистрацией стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения регистрировался выход флуоресценции,

который позволил получить распределения ионов серы и хлора в белковой пленке, сформированной из раствора лизоцима с осадителем NaCl. Выяснено, что ионы хлора образуют тонкий слой у поверхности пленки лизоцима толщиной 0,7 нм. Это свидетельствует о том, что слой ионов осадителя переносится с поверхности водной субфазы вместе с белковым слоем.

**В главе 4** представлены результаты экспериментов по получению и исследованию структурных особенностей ленгмюровских монослоев лизоцима на поверхности жидкости, сформированных из двух типов растворов: без добавления осадителя (монодисперсный раствор белка) и с добавлением осадителя в условиях кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии (полидисперсный раствор). В данном случае осадителем выступал хлорид калия. Проведенный автором анализ экспериментальных кривых малоуглового рентгеновского рассеяния показал, что, монодисперсный раствор белка имеет мономерный состав, а в полидисперсном растворе помимо мономеров присутствует также 10% димеров и 2,3% октамеров.

Анализ толщин полученных монослоев на поверхности жидкости показал, что, как и в случае формирования пленки лизоцима с осадителем NaCl, октамеры лизоцима, которые являются наибольшими из олигомеров, присутствующих в растворе, принимают участие в образовании монослоя, что оказывает влияние на его структуру. Важным является вывод о том, что октамеры, образующиеся в белковом растворе при добавлении осадителя, не только не разрушаются при нанесении раствора на водную поверхность, но и сохраняют свою структуру при формировании ленгмюровского слоя. При анализе автором кривых МУРР, не было обнаружено доказательств наличия развёрнутых молекул, что было определено из безразмерных графиков Кратки, которые имеют форму, типичную для глобулярных белков.

Кроме того, автор приводит расчеты поверхностного заряда октамеров лизоцима с помощью программного пакета APBS - PDB2PQR, для pH ниже изоэлектрической точки лизоцима. Визуализация потенциала октамера лизоцима (в программе PyMol) показывает, что эти молекулы преимущественно имеют положительный поверхностный заряд.

**Глава 5** посвящена получению и изучению структурных особенностей пленок белка лизоцима, полученных с помощью модифицированного метода ЛШ на кремниевых подложках из раствора с параметрами, соответствующими условиям кристаллизации лизоцима моноклинной сингонии (в присутствии осадителя KI). Пленки были сформированы из кристаллизационного раствора, параметры которого (буфер, pH, концентрации белка и осадителя) соответствовали условиям кристаллизации лизоцима моноклинной сингонии. Важным результатом, является то, что толщина полученной предложенным способом пленки белка равна порядка 4 нм, а электронная плотность пленки почти в 4 раза превышает плотность, рассчитанную для пленки, сформированной из раствора белка без добавления осадителя. Такая увеличенная плотность может свидетельствовать о том, что в образовании

пленки в условиях моноклинной сингонии, участвуют олигомеры меньшего размера, чем октамеры (которые участвуют в образовании пленки в тетрагональной сингонии).

Кроме того, по выходу флуоресценции автором было обнаружено, что ионы осадителя формируют над поверхностью пленки тонкие слои, образуя многослойную структуру. Интересным является тот факт, что в данном случае ближе к поверхности пленки располагаются ионы  $K^+$ , а не отрицательно заряженные ионы, как в случае пленок, сформированных с осадителями NaCl и KCl. Полученное распределение ионных слоев говорит о том, что пленка лизоцима (в условиях кристаллизации моноклинной сингонии) имеет, по всей видимости, слабый отрицательный заряд.

В целом, полученные данные подтверждают результаты исследования пленки лизоцима, полученной из раствора с параметрами, соответствующими кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии, что свидетельствует об эффективности метода получения упорядоченных белковых пленок на твердой подложке.

В **Заключении** диссертации приводятся выводы, обобщающие результаты проведенных исследований, в полном соответствии с заявленными целью и задачами работы.

Главные выводы по работе сводятся **к следующему:**

1. Предложен метод получения белковых пленок на твердых подложках, основанный на ленгмюровской технологии, который заключается в использовании предварительно приготовленного раствора белка с образованием олигомеров. Предложенный подход был апробирован на примере белка лизоцима;

2. С помощью метода малоуглового рассеяния рентгеновского излучения показано, что объемная доля наибольших олигомеров лизоцима – октамеров, образующихся в растворе на начальной стадии кристаллизации при добавлении осадителя хлорида калия, составляет приблизительно 2.3 % и мало изменяется в течение периода времени от 0 до 170 минут. Также показано, что в растворе белка без добавления осадителя присутствуют только мономеры лизоцима;

3. Установлена структура пленки лизоцима на кремниевой подложке, сформированной из полидисперсного раствора с добавлением осадителя хлорида натрия, условия которого соответствуют кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии. С помощью метода рентгеновской рефлектометрии показано, что толщина белковой пленки равна 6.5 нм, а плотность практически в 4 раза превышает значение плотности пленки, сформированной из монодисперсного раствора. Исследования методом АСМ показали, что пленка имеет существенно более однородную структуру по сравнению с пленкой белка без осадителя. С помощью метода стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения показано, что

ионы хлора образуют на границе раздела пленка/воздух тонкий слой толщиной 0.7 нм;

4. Получена многослойная структура из ленгмюровского монослоя лизоцима на поверхности водной субфазы и слоев ионов осадителя в субфазе вблизи пленки белка. С помощью метода стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения показано, что толщина белкового монослоя равна 6.5 нм и соответствует диаметру наибольшего олигомера, образующегося в растворе на начальной стадии кристаллизации. Также показано, что ионы осадителя хлорида калия образуют тонкие слои на границе раздела пленка/жидкость, причем слой ионов хлора плотно примыкает к монослою и имеет толщину 0.5 нм, а пик распределения ионов калия смещен в глубь субфазы, и слой имеет толщину 0.7 нм;

5. Установлена структура пленки лизоцима на кремниевой подложке, сформированной из полидисперсного раствора в условиях кристаллизации лизоцима моноклинной сингонии. С помощью метода рентгеновской рефлектометрии показано, что толщина белковой пленки равна 4 нм. С помощью метода стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения показано, что ионы осадителя йодида калия образуют на поверхности пленки тонкие слои, причем толщина слоя ионов йода составляет 1 нм, а толщина слоя ионов калия составляет 2 нм;

6. С помощью методов рентгеновской рефлектометрии и стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения показано, что пленка лизоцима, сформированная из монодисперсного раствора белка, в котором содержатся только мономеры лизоцима, имеет толщину 4 нм, что соответствует диаметру мономера. Исследование методом атомно - силовой микроскопии показало, что пленка имеет «островковую» структуру, что соответствует значению пониженной плотности пленки по данным рентгеновской рефлектометрии по сравнению с пленкой, сформированной из раствора белка с добавлением осадителя.

Выводы к работе четко сформулированы и полностью отражают основные научные результаты, представленные в работе. Результаты, полученные Бойковой Анастасии Сергеевны, являются полностью оригинальными.

Несомненным достоинством работы является применение комплексного подхода к исследованию белковой пленки, начиная со стадии раствора и исследования его олигомерного состава, далее переходя к сформированным из растворов ленгмюровским монослоям на поверхности жидкости и заканчивая получением конечной формируемой пленки на твердой подложке с контролем структуры на всех этапах формирования пленки. При этом на каждом этапе формирования пленок применялись методы структурного исследования: исследование растворов проводилось с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния, исследование ленгмюровских монослоев проводилось с помощью метода стоячих рентгеновских волн в области

полного внешнего отражения; для исследования структуры пленок, сформированных на твердых подложках, применялся комплекс рентгеновских методик, таких как рентгеновская рефлектометрия и стоячие рентгеновские волны в области полного внешнего отражения, а также атомно - силовая микроскопия. Такой подход позволил разработать способ получения белковых многослойных пленок типа «белок-осадитель», применение которых может быть реализовано в конструировании гибридных материалов нового типа.

Достоверность представленных в работе результатов подтверждается использованием современных методов расчета и современного программного обеспечения, использованием современных методов исследования структуры органических систем, приборов и программ; хорошим совпадением расчетных и экспериментальных данных; согласованием экспериментальных результатов, полученных с использованием различных методов исследования для определения структуры исследуемых белковых пленок: рентгеновская рефлектометрия, метод стоячих рентгеновских волн, метод атомно-силовой микроскопии; наличием публикаций в рецензируемых научных изданиях и докладами на различных национальных и международных конференциях.

Автореферат диссертации адекватно отражает ее содержание и соответствует специальности 01.04.07 – «физика конденсированного состояния вещества».

Представленная диссертационная работа выполнена на высоком научно-техническом и исследовательском уровне. Вместе с тем к диссертации имеются некоторые замечания:

1. Для исследования пленок на поверхности жидкости в ленгмюровской ванне и на твердых подложках применялись два метода – рентгеновская рефлектометрия и стоячие рентгеновские волны в области полного внешнего отражения, тогда как структура растворов была исследована только методом малоуглового рентгеновского рассеяния. Желательно было бы дополнить исследования растворов еще одним независимым методом, например, из числа оптических методов, таким как, например, динамическое рассеяние света, которые широко используется для исследования растворов макромолекул.

2. Белок и, тем более, олигомеры, не являются сферически симметричными частицами, их размер будет различным в зависимости от их ориентации относительно поверхностей подложки и жидкости в ленгмюровской ванне. В работе не уточняется, каким образом молекулы лизоцима ориентированы в пленке.

3. Разработанный подход к получению белковых пленок, апробирован на растворах лизоцима с осадителями, являющимися простыми неорганическими солями, в связи с чем возникает вопрос о применимости метода при наличии в растворе других осадителей с более сложной структурой, которые также являются, помимо указанного хлорида натрия, широко используемыми кристаллизационными агентами для белков.

Отмеченные замечания носят скорее рекомендательный характер и не снижают общей высокой оценки рецензируемой работы.

Диссертация изложена четко, грамотно и аккуратно. Хочется отметить хороший литературный язык и отсутствие грамматических и стилистических ошибок, что производит положительное впечатление. По объему полученных результатов, их новизне и актуальности, представленная диссертационная работа Бойковой Анастасии Сергеевны полностью соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным согласно разделу II положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, а ее автор, Бойкова Анастасия Сергеевна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.07 – «физика конденсированного состояния».

Отзыв составил:

Официальный оппонент

Высококвалифицированный  
научный сотрудник лаборатории  
«Когерентная оптика»

Федерального  
государственного бюджетного  
учреждения науки Физического  
института им. П.Н. Лебедева  
Российской академии наук,

Кандидат физико-  
математических наук

Кириченко Марина Николаевна

119991, ГСП-1 Москва,  
Ленинский проспект, д.53.

Телефон: +7 (985) 969 45 33

e-mail:

[maslovamarina87@gmail.com](mailto:maslovamarina87@gmail.com)

17.12.2019

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук

Адрес: 119991, ГСП-1 Москва, Ленинский проспект, д.53.

Электронная почта: [maslovamarina87@gmail.com](mailto:maslovamarina87@gmail.com)

Телефон: +7 (985) 969 45 33

Подпись официального оппонента М.Н. Кириченко заверяю

Ученый секретарь

ФГБУН Физический институт

П.Н. Лебедева РАН

Кандидат физико-математических наук



А.В. Колобов