

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по науке и
инновациям НИТУ «МИСиС»


М.Р. Филонов

«20» декабря 2019 года



ОТЗЫВ

ведущей организации 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 А.С. посвящена разработке метода формирования тонкопленочных упорядоченных белковых структур на основе ленгмюровской технологии из полидисперсных растворов лизоцима и изучению структурных особенностей полученных пленок. В работе впервые были получены ленгмюровские слои лизоцима на поверхности жидкости и твердой подложке, сформированные из полидисперсных растворов, содержащих олигомерные частицы лизоцима, образованные в условиях кристаллизации при добавлении осадителя, и впервые была изучена структура таких пленок.

В настоящее время создание органо-неорганических гибридных систем и материалов на их основе является одной из ключевых задач во многих отраслях, связанных с безопасностью человека и экосистем, фармацевтикой и медицинской диагностикой. На данный момент успешно спроектированы и

реализованы в виде устройств системы, где белки на подложках используются в качестве функциональных единиц в биосенсорах, в которых молекулы белков организованы в виде двумерного слоевого ансамбля. Однако в большей части подобных устройств используемые белковые пленки не структурированы, и в такой системе белковые молекулы функционируют как не связанные друг с другом единицы. По этой причине развитие новых подходов для получения упорядоченных белковых пленок является актуальной задачей на сегодняшний момент и в целом будет важным этапом на пути создания биоорганических гибридных систем. Таким образом, задача получения устойчивых и стабильных белковых тонкопленочных систем является актуальной и сложной, требующей комплексного подхода.

В диссертационной работе Бойковой А.С. был предложен и применен ранее не использованный подход к получению белковых пленок на основе ленгмюровской технологии, основанный на формировании пленок белков из полидисперсного раствора, одним из компонентов которого является предкристаллизационный кластер – белковый олигомер. Предполагается, что такие олигомеры, образующиеся в растворе белка при добавлении осадителя, являются структурированными элементарными единицами роста будущего кристалла лизоцима.

Научной новизной работы, прежде всего, является разработка способа получения ленгмюровских белковых слоев, который заключается в использовании полидисперсных растворов, содержащих белковые кластеры-олигомеры. Также в работе с помощью методов рентгеновской рефлектометрии и стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения было проведено изучение структуры таких белковых пленок и было показано, что на поверхности жидкости в ленгмюровской ванне при формировании пленки лизоцима из полидисперсного раствора происходит образование многослойной структуры из слоев белковых молекул и слоев

ионов осадителя; также было показано, что ионы осадителя образуют слои на границе раздела воздух/белковая пленка. Практическая значимость работы заключается в том, что такие тонкопленочные многослойные структуры, основанные на комбинации молекул белков, слоев ионов осадителя и твердой неорганической подложки, могут быть применены для конструирования гибридных органо-неорганических систем.

Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, выводов и списка цитируемой литературы. Во введении содержится обоснование актуальности работы, излагаются цели и задачи диссертационной работы, а также отмечены ее новизна и практическая значимость.

В первой главе содержится литературный обзор, посвященный методам получения белковых пленок и методам структурных исследований слоевых органических ансамблей и приповерхностных слоев. В целом, обзор достаточно полно отражает состояние проблем, решаемых в данной диссертации.

Во второй главе приводится описание способа получения белковых пленок на твердых подложках и на поверхности жидкости, а также структурных методов исследования, примененных в данной работе. В главе детально описано, каким образом проводилось приготовление полидисперсных растворов, описаны методы получения белковых пленок и методы исследования их структуры, примененных в процессе работы. Особо следует выделить разработанную при участии автора диссертации модификацию метода получения белковых пленок на основе ленгмюровской технологии при использовании кристаллизационных растворов.

В третьей главе приводится описание результатов, полученных при исследовании пленок белка лизоцима на твердых подложках с помощью разработанного подхода из кристаллизационных растворов лизоцима тетрагональной сингонии. Показано, что такой подход действительно

приводит к образованию на подложках упорядоченной белковой пленки из олигомеров лизоцима.

В четвертой главе описаны результаты, полученные при исследовании ленгмюровских слоев лизоцима из раствора белка с осадителем, где было показано, что сформированные слои имеют толщину, сопоставимую с размером октамера лизоцима, в то время как пленки, сформированные из монодисперсного раствора, имеют толщину, равную размеру мономера лизоцима. Полученные данные указывают, что структура пленок сохраняется при переносе слоев с поверхности жидкости на твердые подложки, что говорит о стабильности полученных пленочных систем.

В пятой главе излагаются результаты, полученные при апробации предложенного способа получения белковых пленок на примере лизоцима в условиях кристаллизации моноклинной сингонии. Данные подтверждают эффективность предложенного способа получения пленок, развитого в данной работе.

Основными выводами диссертационной работы Бойковой А.С. являются:

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 атомно-силовой микроскопии 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.

По диссертации Бойковой А.С. можно сделать следующие замечания:

1. Подход к получению белковых пленок, разработанный диссертантом, был применен только к модельному белку лизоцима, в связи с чем в работе отсутствуют данные о применимости предложенного способа к другим белкам с более сложной структурной организацией;

2. Для исследования структуры используются методы исследования, основанные на взаимодействии рентгеновского излучения с биоорганическим веществом, которое может подвергнуться разрушению ввиду высокой интенсивности излучения, однако в работе эта возможность не обсуждается;

3. Автор рассматривает олигомеры, образующиеся в растворе лизоцима в условиях кристаллизации тетрагональной и моноклинной сингонии, как единицы, участвующие в формировании пленок. Было бы интересно обсудить, будут ли в растворе других белков образовываться подобные олигомеры.

Отмеченные недостатки не снижают ценности работы и не затрагивают основные выводы, поэтому не влияют на ее общую положительную оценку.

Необходимо отметить личный вклад соискателя, который состоит в получении всех исследованных образцов – монослои на поверхности жидкости и белковые пленки на твердых подложках. Автор непосредственно принимала участие в проведении рентгеновских экспериментов в лабораторных условиях и на источниках синхротронного излучения.

Материал диссертации изложен достаточно четко и последовательно. Наглядные рисунки, графики и таблицы хорошо иллюстрируют полученные автором результаты. Диссертация представляет собой цельную, завершенную научно-исследовательскую работу по актуальной тематике и обладает существенной практической значимостью. Достоверность представленных в работе результатов подтверждается использованием современных методов расчета и современного программного обеспечения, а также наличием публикаций в рецензируемых научных изданиях и докладами на различных национальных и международных конференциях.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 12 публикациях, из которых 3 статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК и один патент. Также результаты работы были апробированы на семинарах, научных школах, российских и международных конференциях.

Диссертационная работа Бойковой А.С. представляет собой законченную научно-квалификационную работу, соответствующую всем критериям и требованиям раздела 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».

Диссертационная работа Бойковой А.С. «Формирование тонкопленочных упорядоченных белковых структур из полидисперсных кристаллизационных растворов лизоцима» заслушана и обсуждена на заседании семинара кафедры материаловедения полупроводников и диэлектриков Национального исследовательского технологического университета «МИСиС», протокол № 9/19 от 07 ноября 2019 года.

Отзыв заслушан и утвержден на заседании семинара кафедры материаловедения полупроводников и диэлектриков Национального исследовательского технологического университета «МИСиС» протокол № 10/19 от 19 декабря 2019 года.

Отзыв составил:

Д.ф.-м.н., профессор

В.Т. Бублик

К.ф.-м.н., ведущий инженер

К.Д. Щербачев

Уч. Секретарь кафедры МПид, к.ф.-м.н.

И.С. Диденко

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС».

Адрес: 119049, г. Москва, Ленинский проспект, д. 4. Тел.: +7(495) 955-00-32

Оф. сайт: <https://misis.ru/> E-mail: kancela@misis.ru