

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 изучению структурных особенностей пленок белка лизоцима, сформированных с помощью метода разработанного на основе ленгмюровской технологии из кристаллизационных растворов.

К настоящему времени успешно спроектированы и реализованы в виде устройств, где молекулы белков организованы в виде слоевого ансамбля на подложке и используются в качестве функциональных единиц в биосенсорах. Однако физическое поведение подобного молекулярного ансамбля, в котором функционируют одновременно множество отдельных белковых молекул, может быть чрезвычайно неустойчивым и зависящим от множества внешних факторов. В большей части подобных устройств молекулы белка организуются в молекулярный слой на подложке из жидкой неупорядоченной среды - белкового раствора, в котором они пребывают в виде отдельных молекул. Ранее на примере низкомолекулярных органических соединений было показано, что использование упорядоченных слоевых структур при создании функциональных материалов по сравнению с неупорядоченными способно значительно повысить их эффективность. Это позволяет предположить, что эффективность биосенсорных устройств также можно повысить, применяя для их создания упорядоченные белковые пленки. По этой причине развитие новых подходов для получения упорядоченных белковых пленок является актуальной задачей на сегодняшний момент и в целом является важным этапом на пути создания биоорганических гибридных систем.

Диссертантом предложен, развит и применен ранее не использованный подход к получению белковых пленок на основе ленгмюровской технологии, которая основана на формировании пленок белков из полидисперсного раствора, одним из компонентов которого является предкристаллизационный олигомер самого белка. Данный подход был апробирован автором диссертации на модельном белке лизоциме, причем компоненты раствора, такие как осадитель и буфер, соответствовали условиями роста кристаллов лизоцима тетрагональной и моноклинной сингонии.

С помощью методов структурной рентгеновской рефлектометрии и стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения, было показано, что при формировании слоев на поверхности жидкости в ленгмюровской ванне и пленок на твердых подложках из кристаллизационного раствора лизоцима образуется многослойная структура из слоев белковых молекул и слоев ионов осадителя. В процессе работы было установлено, что пленки, сформированные из полидисперсных растворов олигомеров лизоцима, образующиеся на начальной стадии кристаллизации, являются более однородными и плотноупакованными по сравнению с пленками, сформированными из монодисперсных растворов.

Такие тонкопленочные системы, состоящие из организованных в виде упорядоченного слоя молекул белка на неорганической кремниевой подложке, в дальнейшем могут быть применены для конструирования органо-неорганических гибридных систем и созданию материалов с новыми свойствами. По этой причине актуальность диссертационной работы Бойковой А.С. не вызывает сомнений.

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.

В первой главе диссертационной работы представлен широкий обзор литературы, посвященный основным способам получения белковых

структур, используемых в настоящее время, и методам их исследования, причем особое внимание уделено рентгеновским методам.

Во второй главе дано подробное описание условий получения образцов, исследованных в диссертационной работе, приведено описание установок и синхротронных станций, с помощью которых проводились структурные исследования.

Третья глава посвящена получению и исследованию пленок белка лизоцима на твердых подложках, полученных с помощью модифицированного метода на основе ленгмюровской технологии из монодисперсного и полидисперсного растворов белка с добавлением осадителя - хлорида натрия.

В четвертой главе описано получение и исследование 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); приведены также данные малоуглового рассеяния рентгеновского излучения о составе олигомерного монодисперсного и полидисперсного раствора лизоцима с осадителем хлоридом калия.

Пятая глава посвящена получению и исследованию структурных особенностей пленок белка лизоцима, полученных с помощью модифицированного метода основе ленгмюровской технологии на кремниевых подложках из раствора с параметрами, соответствующими условиям кристаллизации лизоцима моноклинной сингонии.

На мой взгляд, среди наиболее важных результатов, представленных в диссертации, следует выделить следующее:

1. Автором диссертации предложен новый способ 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. Исследована структура пленки лизоцима на кремниевой подложке, сформированной из полидисперсного раствора с добавлением осадителя хлорида натрия в условиях кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии. Установлено, что толщина такой пленки сравнима с размером предкристаллизационного кластера лизоцима - октамера, образующегося в растворе на начальной стадии кристаллизации.
3. В ленгмюровской ванне на поверхности жидкости из полидисперсного раствора лизоцима была сформирована многослойная структура, состоящая из молекул белка и слоев ионов осадителя. С помощью метода стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения было показано, что, во-первых, толщина ленгмюровского слоя сопоставима с размером октамера лизоцима из полидисперсного раствора, и во-вторых, что ионы осадителя хлорида калия формируют тонкие слои на границе раздела жидкость/пленка.
4. Установлено, что при формировании пленки из раствора лизоцима в условиях роста моноклинной сингонии также образуется пленка толщиной 4 нм и плотностью, сопоставимой с плотностью пленки из раствора с условиями роста тетрагональной фазы. Показано, что ионы осадителя йодида калия схожим образом формируют тонкие слои на поверхности пленки.

Достоверность представленных в работе результатов не вызывает сомнений так как все результаты представленные в диссертации получены с использованием современных приборов и многократно апробированных рентгеновских методик, с использованием современного программного обеспечения и алгоритмов расчета. Все результаты полученные автором диссертации опубликованы в рецензируемых научных изданиях и обсуждены на различных национальных и международных конференциях.

Несомненным достоинством работы является применение метода стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения к исследованию ленгмюровских слоев лизоцима на поверхности жидкости, сформированных из полидисперсных растворов. Данный подход позволил не только определить положение молекул лизоцима, но и напрямую детектировать положение ионов осадителя и показать, что ионы организованы в виде тонких слоев вблизи пленки белка, что указывает на их непосредственное взаимодействие с лизоцимом. И, не смотря на то, что использование данного метода не является новым в области исследования органических слоев, в том числе и белковых систем, уникальностью работы является применение метода стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения к исследованию белковых слоев, сформированных из кристаллизационных растворов с целью получения информации о распределении ионов осадителя относительно молекул белка.

Практическая значимость работы состоит в разработке способа получения тонкопленочных многослойных структур на основе комбинации слоев белковых молекул, ионов осадителя и неорганической подложки, которые в перспективе могут быть использованы при создании органо - неорганических гибридных систем. Также изучение особенностей взаимодействия белковой пленки с пленкой ионов осадителя может дать новую информацию о взаимодействии между молекулами белков и осадителем в растворе в условиях кристаллизации.

Основные результаты диссертационной работы, опубликованные в 12 публикациях, из которых 3 статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК, прошли успешную апробацию на ряде международных и всероссийских конференциях. Также по результатам работы был получен патент «Способ получения упорядоченных пленок лизоцима на твердых подложках в ленгмюровской ванне», одним из авторов которого является диссертант.

Личный вклад диссертанта не вызывает сомнений. Автором диссертации получены все изученные в процессе работы образцы – 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.

Как и любая большая работа, рецензируемая диссертация, на мой взгляд, не лишена некоторых недостатков, а точнее пожеланий.

1. Предложенный подход к получению белковых пленок был апробирован только на одном белке. Было бы интересно сравнить результаты, полученные на другом объекте, будут ли указанные закономерности выполняются и в этом случае.

2. Вывод об участии олигомеров сделан только на основе сопоставления данных о толщине пленок, сформированных из кристаллизационных растворов. Желательно было бы подтвердить факт участия олигомеров в построении пленки с помощью дополнительного независимого метода.

3. Текст диссертационной работы не лишен пунктуационных и грамматических ошибок и опечаток. Так, в подписи к рис. 4.2 в слове "визуализации" пропущено окончание; методика получения всех образцов приводится сначала во второй главе, а затем кратко написана в начале каждой главы перед основными результатами.

Все вышеперечисленные замечания носят в основном рекомендательный характер и ни коем случае не снижают ценность выполненных диссертантом работ и не могут повлиять на общую, высокую положительную оценку рецензируемой работы.

Автореферат диссертации адекватно (кратко и в то же время достаточно полно) отражает содержание диссертационной работы. Публикации автора сделаны в престижных рецензируемых журналах, отраженных в списке ВАКа. Материалы диссертации неоднократно обсуждались на международных и национальных конференциях и семинарах.

На основании всего вышеизложенного считаю, что диссертационная работа А.С. Бойковой представляет собой завершённую 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».

Отзыв составил 26-12-2019:
Официальный оппонент,
Эрнест Витальевич Суворов

Доктор физико-математических наук, профессор, главный научный сотрудник ЛСА (Лаборатории структурных исследований) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физики твердого тела Российской академии наук.

142432, Россия, Московская обл., г. Черноголовка,

ул. Академика Ю.А. Осипяна, д. 2, ИФТТ РАН

Телефон: 8 (496) 522 8403

Электронная почта: suvorov@issp.ac.ru

Подпись официального оппонента Э.В. Суворова заверяю

Ученый секретарь Ученого Совета ИФТТ РАН

кандидат физ.-мат. наук Терещенко Алексей Николаевич

