

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.114.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КРИСТАЛЛОГРАФИЯ И
ФОТОНИКА» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ
ИЛЬИНОЙ КСЕНИИ БОРИСОВНЫ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 4 февраля 2020 г., протокол № 1

О присуждении **Ильиной Ксении Борисовне**, гражданке Российской Федерации, учёной степени кандидата физико-математических наук.

Диссертация «Закономерности изменения структуры растворов белка лизоцима при росте кристаллов тетрагональной сингонии» по специальности 01.04.07 – «физика конденсированного состояния» принята к защите 26.11.2019 г., протокол № 7, диссертационным советом Д 002.114.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук» (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН), Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Минобрнауки России), 119333, г. Москва, Ленинский проспект, дом 59. Диссертационный совет Д 002.114.01 создан приказом Федеральной службы по надзору в сфере образования и науки № 105/нк от 11.04.2012 г.

Соискатель Ильина Ксения Борисовна, 1990 г.р., в 2016 г. окончила кафедру физики твердого тела и наносистем факультета экспериментальной и теоретической физики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ». В настоящее время работает в лаборатории рентгеновских методов анализа и синхротронного излучения структурного подразделения ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН – «Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН» (ИК РАН), Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в должности младшего научного сотрудника.

Диссертационная работа выполнена в лаборатории рентгеновских методов анализа и синхротронного излучения структурного подразделения ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН – ИК РАН, Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель **Ковальчук Михаил Валентинович** – доктор физико-математических наук, профессор, член-корреспондент РАН, президент НИЦ «Курчатовский институт».

Официальные оппоненты:

Авдеев Михаил Васильевич, доктор физико-математических наук, начальник сектора нейтронной оптики Лаборатории нейтронной физики им. И.М. Франка Объединенного института ядерных исследований;

Тищенко Светлана Викторовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории структурных исследований аппарата трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии наук;

— дали **положительные отзывы** на диссертацию.

Ведущая организация **Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»** (г. Москва) в своём положительном отзыве, подписанном доктором физико-математических наук, профессором В.Т. Бубликом, кандидатом физико-математических наук, ведущим инженером К.Д. Щербачевым, ученым секретарем кафедры материаловедения полупроводников и диэлектриков, кандидатом физико-математических наук И.С. Диденко, и утвержденном проректором по науке и инновациям ФГАОУ ВО НИТУ «МИСиС» М.Р. Филоновым, указала, что диссертационная работа «Закономерности изменения структуры растворов белка лизоцима при росте кристаллов тетрагональной сингонии» посвящена исследованию актуальной темы переходных процессов, происходящих при кристаллизации таких сложных объектов, как белковые молекулы. Проблема самоорганизации молекул, приводящих к росту кристаллов, изучается давно, но до конца точно не известно, как именно растут кристаллы. Фундаментальное изучение процессов роста белковых кристаллов открывает широкие возможности для управления кристаллизацией и определения трехмерной структуры белковых молекул. Научная новизна работы заключается в том, что впервые изучено изменение фазового состояния, структуры, раствора лизоцима при добавлении хлорида натрия, приводящего к росту кристаллов. Определен олигомерный состав кристаллизационного раствора в широком диапазоне условий. Впервые исследовано влияние температуры, концентрации и типа растворителя на структуру кристаллизационного раствора лизоцима. Основные результаты работы можно кратко сформулировать следующими заключениями. В кристаллизационном растворе лизоцима (условия роста кристаллов тетрагональной сингонии) присутствуют помимо мономеров, димеры и октамеры, соответствующие структуре кристаллов данного белка, выращенного в этих же условиях. Добавление в качестве осадителя хлорида натрия к раствору лизоцима приводит к образованию устойчивой фазы из октамеров лизоцима. В случае,

когда кристаллизация невозможна, раствор состоит преимущественно из отдельных молекул лизоцима. Было изучено влияние важнейших параметров кристаллизации: температуры, концентрации белка и типа растворителя. Обнаружено, что объемная доля октамеров увеличивается при понижении температуры и увеличении концентрации белка. Также было показано, что объемная доля октамеров в кристаллизационном растворе лизоцима, где растворителем являлась дейтерированная вода, значительно превышает объемную долю таких же олигомеров в протонированной воде. При этом равная концентрация октамеров в кристаллизационном растворе лизоцима в дейтерированной и протонированной воде обнаружена, когда температура раствора в протонированной воде на 10 °С ниже, чем в дейтерированной воде. Результаты работы помимо фундаментальной значимости имеют и практическое применение. Исследование закономерностей роста белковых кристаллов позволит усовершенствовать процесс и сократить время поиска условий кристаллизации, получения кристаллов и определения структуры белковых молекул. Диссертационная работа Ильиной К.Б. представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, соответствующую всем критериям и требованиям раздела II «Положения о присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г №842, а ее автор, Ильина Ксения Борисовна, заслуживает присуждения степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.07 – «Физика конденсированного состояния».

Соискатель имеет 16 опубликованных работ по теме диссертации, из них 3 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в утвержденный ВАК перечень ведущих рецензируемых научных изданий. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

Ю.А. Дьякова, **К.Б. Ильина**, П.В. Конарев, А.Е. Крюкова, М.А. Марченкова, А.Е. Благов, В.В. Волков, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук // Кристаллография. 2017. Т. 62. № 3. С. 364–369.

A.S. Boikova, Y.A. Dyakova, **K.B. Iina**, P.V. Konarev, A.E. Kryukova, A.I. Kuklin, M.A. Marchenkova, V.V. Nabatov, A.E. Blagov, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk // Acta Crystallographica Section D. 2017. V. 73. №7. P. 591–599.

А.С. Бойкова, Ю.А. Дьякова, **К.Б. Ильина**, П.В. Конарев, А.Е. Крюкова, М.А. Марченкова, А.Е. Благов, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук // Кристаллография. 2017. Т. 62. № 6. С. 876–881.

К.Б. Iina, A.S. Boikova, Y.A. Dyakova, P.V. Konarev, M.A. Marchenkova, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk // Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 2018. V. 50. № 6. P. 543–544.

На диссертацию и автореферат поступило **6 положительных отзывов**.

Можаев Андрей Александрович – к.х.н., научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, прислал отзыв **без замечаний**.

Терещенко Надежда Алексеевна – к.б.н., младший научный сотрудник отдела экологического и медицинского приборостроения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей физики имени А.М. Прохорова Российской академии наук, отметила в качестве замечания, что объектом исследования был выбран модельный белок лизоцим. Интересно было бы увидеть, образуются ли структурированные олигомеры в кристаллизационных условиях других белков. В тексте присутствуют опечатки.

Бойко Константин Михайлович – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории инженерной энзимологии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», прислал отзыв **без замечаний**.

Долгушин Сергей Анатольевич – к.ф.-м.н., директор общества с ограниченной ответственностью «Айвок», отметил в качестве замечаний, что в автореферате при описании актуальности проблемы сказано, что образование агрегатов было продемонстрировано методами динамического рассеяния света и статистического рассеяния света. Однако данные результаты в автореферате не представлены. В тексте встречаются опечатки, например, «тетраме» в таблице 1.

Далечина Александра Владимировна – к.ф.-м.н., медицинский физик акционерного общества «Деловой центр нейрохирургии», отметила в качестве замечаний, что на рис. 6 помимо графика с результатами также представлены фотографии кристаллов, полученные во время эксперимента. В тексте автореферата нет описания этих кристаллов, следовало убрать фотографии кристаллов и оставить только график. В тексте самой диссертационной работы фотографии кристаллов уместны, рисунок подробно описан. Автореферат перегружен рисунками. Например, рис. 2 можно было бы не приводить в тексте, а представить в виде рисунков только основные результаты.

Карцев Петр Федорович – к.ф.-м.н., доцент Института лазерных и плазменных технологий офиса Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», прислал отзыв **без замечаний**.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что оппоненты являются ведущими специалистами в области структурных исследований белков методами рентгеноструктурного анализа и малоуглового рассеяния рентгеновского излучения и нейтронов, а в

ведущей организации активно проводятся работы по изучению структуры и процессов роста кристаллов различными экспериментальными методами.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований изучено влияние температуры, концентрации белка и типа растворителя на структуру раствора лизоцима в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии. Использование методов малоуглового рассеяния рентгеновского излучения и нейтронов в сочетании с анализом структуры кристалла лизоцима и моделированием олигомеров позволило **определить** состав кристаллизационного раствора лизоцима. **Показано**, что добавление к раствору лизоцима в качестве осадителя хлорида натрия приводит к образованию олигомеров двух типов: димеров и октамеров. При этом эти олигомеры соответствуют структуре будущего кристалла. **Установлено**, что в кристаллизационном растворе лизоцима отсутствуют промежуточные олигомеры (тетрамеры и гексамеры) и олигомеры порядка выше октамера. Существование структурированных олигомеров было обнаружено в диапазоне температур и концентраций белка от 30 до 10 °С и 10 до 60 мг/мл соответственно и при использовании двух типов растворителей: дейтерированной и протонированной воды. **Исследовано** влияние температуры и концентрации белка на структуру раствора лизоцима при кристаллизации, **показано**, что при понижении температуры объемная доля октамеров увеличивается, а при понижении концентрации белка – уменьшается. Также было **изучено** влияние типа растворителя протонированной и дейтерированной воды на структуру раствора лизоцима в условиях кристаллизации. **Установлено**, что при замене растворителя с протонированной воды на дейтерированную, увеличивается объемная доля октамеров. При этом обнаружено, что концентрации октамеров в кристаллизационных растворах лизоцима совпадают при понижении температуры раствора в H₂O на ~ 10 °С, относительно в D₂O. Проведение как рентгеновских, так и нейтронных малоугловых экспериментов при исследовании структуры кристаллизационных растворов лизоцима в тяжелой воде позволило повысить надежность анализа данных путем сравнения полученных результатов и исключения возможного влияния радиационного повреждения образцов при использовании рентгеновского излучения.

Значение полученных соискателем результатов исследований для практики подтверждается тем, что результаты работы могут быть использованы для разработки новых методик и технологий кристаллизации белков, основанных на исследовании структуры кристаллизационного раствора и обнаружении формирования упорядоченных олигомеров белка в растворе. Такая методика позволит задолго до появления белкового кристалла определять, насколько условия подходят для кристаллизации, тем самым позволит

существенно сократить время поиска условий кристаллизации, получения кристаллов и определения их трехмерной структуры.

Оценка достоверности результатов диссертационной работы выявила, что экспериментальные результаты получены соискателем с применением комплекса взаимодополняющих экспериментальных методов с использованием современного оборудования (ДИКСИ НИЦ КИ, Москва, Россия; BM29 BioSAXS, ESRF, Гренобль, Франция; ЮМО ИБР-2, ОИЯИ, Дубна, Россия). Достоверность результатов также обеспечивается получением большого объема экспериментальных данных и использованием современных программ и известных алгоритмов, апробированных для анализа данных рассеяния от полидисперсных растворов. Обоснованность положений, выносимых соискателем на защиту, подтверждается хорошей воспроизводимостью и согласованностью экспериментальных данных, полученных разными методами. По материалам диссертации опубликовано **3 статьи** в рецензируемых научных журналах, **входящих** в список рекомендованных ВАК, а также представлены доклады на национальных и международных научных конференциях.

Личный вклад соискателя состоял в подборе условий экспериментов, изготовлении образцов для исследования структуры растворов белка лизоцима методами малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и нейтронов. Автор принимала участие в анализе кристаллической структуры тетрагонального лизоцима и моделировании упорядоченных олигомеров на ее основе. Автор непосредственно участвовала в проведении всех описанных в диссертационной работе экспериментов на источниках синхротронного и нейтронного излучений методами малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и нейтронов (ДИКСИ, НИЦ КИ, Москва, Россия, BM29 BioSAXS, ESRF, Гренобль, Франция; ЮМО ИБР-2, ОИЯИ, Дубна, Россия). Обсуждение результатов и их интерпретация проводились совместно с научным руководителем и соавторами публикаций.

Диссертация отвечает на ключевые вопросы поставленной научной проблемы и соответствует критерию внутреннего единства. Объединяющим фактором и основной идейной линией являются исследования структуры растворов комплексом методов малоуглового рассеяния с применением современных подходов к обработке экспериментальных данных. Результаты работы представляют интерес как с точки зрения физики конденсированных сред, так и с точки зрения практических применений в получении кристаллов белков.

Диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует критериям, установленным Положением о порядке присуждения учёных степеней, утверждённым постановлением Правительства Российской Федерации от **24 сентября 2013 г. № 842**.

На заседании 4 февраля 2020 года диссертационный совет принял решение присудить Ильиной Ксении Борисовне учёную степень кандидата физико-

математических наук по специальности 01.04.07 – «физика конденсированного состояния».

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 5 докторов наук по специальности 01.04.07 – «физика конденсированного состояния», участвовавших в заседании, из 25 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 18, против – 0, недействительных бюллетеней – 1.

Председатель диссертационного совета,
член-корреспондент РАН

М.В. Ковальчук

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

К.В. Фролов

« 4 » февраля 2020 г.

Учёный секретарь ФНИЦ
«Кристаллография и фотоника» РАН
к.ф.-м.н.



Л.А. Дадинова