

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Марченковой Маргариты Александровны
**«Особенности различных стадий кристаллизации лизоцима и получение
планарных структур на основе белков цитохрома с и лизоцима»**,
представленную на соискание ученой степени кандидата физико-
математических наук по специальности
01.04.18 – «Кристаллография, физика кристаллов»

Диссертационная работа Марченковой М. А. посвящена разработке и исследованию гибридных наносистем на основе сочетания органических и неорганических компонент. В качестве органических компонент подсистемы в работе использованы белки цитохром с и лизоцим. Оказалось, что такие системы обладают уникальными свойствами. По-видимому, это связано в первую очередь с тем, что характеристики таких наносистем не являются просто суммой свойств отдельных компонент. Важность получения и исследования таких систем обусловлена возможностью широкого применения гибридных наносистем практически во многих областях промышленности и медицины. Одно из таких направлений – создание различных сенсоров. Поэтому актуальность темы диссертационной работы Марченковой М. А. не вызывает сомнений.

Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов и списка цитируемой литературы. Объем работы составляет 144 страницы, включая 66 рисунков, 3 таблицы и список литературы из 138 наименований.

В первой главе дан большой обзор литературы по методам получения органических компонент гибридных наносистем в виде тонких пленок и белковых кристаллов, в том числе используемых в диссертационной работе, а также представлены работы по исследованию формирования пленок белка цитохрома с и изучению различных стадий получения структур лизоцима.

Во второй главе дано подробное описание методов структурных исследований, которые применяли в работе. Описаны методы получения органических структур (методы Ленгмюра-Блоджетт, Ленгмюра-Шеффера, кристаллизация белков методом диффузии паров), а также методы исследования структуры, исследуемых образцов: метод рентгеновской рефлектометрии, стоячих рентгеновских волн, дифрактометрии, малоуглового рассеяния рентгеновских лучей. Большое внимание уделено адаптации методов к исследуемым образцам (развитие метода стоячих рентгеновских волн без регистрации вторичного излучения, создание специальной ячейки с рентгенопрозрачным окном, управление условиями кристаллизации при помощи температуры).

Третья глава посвящена формированию ленгмюровских пленок цитохрома с, исследованию кинетики процесса образования пленок белка с липидным ленгмюровским монослоем. Также описаны условия получения

тонкопленочных структур лизоцима, как на поверхности жидкости, так и на твердых подложках.

В четвертой главе описаны результаты *in situ* исследования процессов роста и деградации кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии методом рентгеновской дифрактометрии в разработанной герметичной ячейке с рентгенопрозрачным окном. Данная ячейка позволяет сохранять кристаллы белков в течение длительного времени (месяца) и исследовать процессы роста различными рентгеновскими методами.

Пятая глава посвящена изучению структуры кристаллизационного раствора лизоцима в условиях кристаллизации тетрагональной формы. Методом молекулярного моделирования из известной структуры кристалла лизоцима выделены олигомеры, образование которых в растворе в условиях кристаллизации подтверждено методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей. Показано, что при различных температурах, соответствующих разным условиям кристаллизации, в растворе меняется распределение олигомеров. Из чего сделано заключение о том, что октамер является строительным элементом кристалла лизоцима тетрагональной сингонии.

Из наиболее интересных результатов представленных в диссертации, на мой взгляд, следует выделить следующее:

1. Автором диссертации предложен новый способ определения структуры поверхностного слоя на основе разработанного модифицированного метода «стоячих рентгеновских волн» без регистрации вторичных процессов в условиях многоволнового взаимодействия различных порядков дифракционного отражения от одного семейства атомных плоскостей.
2. Впервые проведены рентгендифракционные исследования белков в процессе их роста с помощью специально разработанной кристаллизационной ячейки.
3. Установлена связь между комплексами молекул лизоцима, образующимися в растворе на ранней стадии кристаллизации, и структурой полученного белкового кристалла;
4. Методом молекулярного моделирования из структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии выделены возможные олигомеры, которые могут являться элементарным строительным блоком соответствующего кристалла, существование которых подтверждено методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей.

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается: большим объемом экспериментальных данных, полученных с использованием широкого набора методик; квалифицированным анализом изучаемых явлений, сделанным на основе разумных физических предположений; хорошим совпадением расчетных и экспериментальных

данных; согласованием экспериментальных результатов, полученных с использованием развиваемых в работе методов исследования, с данными, полученными с помощью других экспериментальных методик. Автор диссертации в процессе работы использовала целый спектр экспериментальных методик для определения структуры исследуемых органических компонент гибридных наносистем на различных стадиях их формирования: рентгеновская рефлектометрия, метод стоячих рентгеновских волн, рентгеновская дифрактометрия, методы малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, оптические исследования.

Практическая ценность работы заключается в применении: развитой модификации метода стоячих рентгеновских волн без регистрации вторичных процессов к исследованию особенностей структуры органических многослойных систем; разработанной ячейки для проведения рентгеновских исследований структуры белковых кристаллов в процессе их роста, а также в условиях внешних воздействий; результатов о взаимосвязи образования олигомеров с началом процесса кристаллизации для нового алгоритма оптимального и быстрого поиска условий кристаллизации.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 13 публикациях, из которых 5 это статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК и прошли успешную апробацию на ряде крупнейших Российских и Международных конференциях и семинарах.

Как и любая большая работа, рецензируемая диссертация не лишена определенных недостатков или замечаний. Приведу основные, на мой взгляд, погрешности.

Представленная диссертационная работа выполнена на высоком экспериментальном и теоретическом уровне. Вместе с тем в диссертации имеются определенные погрешности.

1. В Главе 3 разрабатываются несколько методов получения тонкопленочных структур лизоцима, однако исследование структуры проводили для образцов, полученных только одним методом.
2. В Главе 4, посвященной исследованию *in situ* процессов роста и деградации кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии на различных подложках, качество полученных кристаллов определялось по полуширине кривых дифракционного отражения (КДО). При этом возможности изучения дефектной структуры использованы далеко не в полном объеме. В частности, нет вариации КДО по кристаллу при его росте и особенно деградации.
3. Исследования *in situ* процессов роста и деградации белкового кристалла, изменения его дефектной структуры желательнее дополнить изучением влияния температуры.
4. В разделе «Научная новизна» на мой взгляд, неудачно сформулировано первое предложение первого пункта «Разработан модифицированный метод на основе метода стоячих рентгеновских волн в условиях

многоволнового взаимодействия различных порядков дифракционного отражения от одного семейства атомных плоскостей».

5. В разделе «На защиту выносятся» в пятом пункте неудачно написано фраза «...изменения состояния молекул лизоцима...». По-видимому, автор имеет в виду какие-то параметры состояния молекул.

Сделанные замечания не носят принципиального характера и не могут существенным образом повлиять на общую, высокую положительную оценку рецензируемой работы. Представленная диссертационная работа выполнена на высоком экспериментальном и теоретическом уровне.

К достоинствам диссертации, несомненно, следует отнести хороший язык, которым написаны диссертация и автореферат.

Автореферат диссертации адекватно и достаточно полно отражает содержание диссертационной работы. Публикации автора сделаны в престижных рецензируемых журналах отраженных в списке ВАКа.

На основании всего вышеизложенного считаю, что диссертационная работа М.А. Марченковой удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации и установленным постановлением правительства российской федерации от 24 сентября 2013 г. n 842 «о порядке присуждения ученых степеней» предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.18 – «Кристаллография, физика кристаллов».

Отзыв составил:

Официальный оппонент,

25.05.2016

Эрнест Витальевич Суворов

Доктор физико-математических наук, профессор

Главный научный сотрудник лаборатории структурных исследований ИФТТ РАН, 142432, Россия, Московская обл., г. Черноголовка, ул. Академика Ю.А. Осипяна, д. 2

Телефон: 8 (49652) 28403

Электронная почта: suvorov@issp.ac.ru

Подпись официального оппонента Э.В. Суворова заверяю

Ученый секретарь Ученого Совета ИФТТ РАН

д.ф.-м.н.



Галина Евгеньевна Абросимова