

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

**о диссертации на соискание ученой степени доктора физико-математических наук Пенькова Никиты Викторовича на тему: «Молекулярная организация водных растворов биомолекул», по специальностям 1.5.2. – «Биофизика» и 1.1.10 – «Биомеханика и бионинженерия»**

Диссертационная работа Н.В. Пенькова посвящена изучению молекулярной организации водных растворов биомолекул. В живой природе все биологические процессы происходят в водной среде. Взаимодействие биомолекул с водным окружением и друг с другом является одним из жизненно важных процессов. Диссертационное исследование Н.В. Пенькова по этой теме, несомненно, является актуальным.

Диссертация состоит из введения, четырех глав основной части, заключения, выводов и списка цитируемой литературы из 555 наименований.

Во введении обосновывается актуальность работы, очерчиваются новизна и степень разработанности темы, формулируются цель, задачи, теоретическая и практическая значимость работы, описываются объекты исследования, излагаются принципы применяемых методик, заявляются выносимые на защиту положения, приводятся данные об апробации результатов работы и личном вкладе автора.

В первой главе проводится обстоятельный литературный обзор, посвященный молекулярной организации водных растворов биомолекул. Гидратация биомолекул рассматривается как с точки зрения формирования особых структур из молекул воды вблизи поверхности биомолекул, так и с точки зрения поведения структуры самой воды под влиянием биомолекул. Последовательно рассматриваются характеристики гидратации основных типов биомолекул — белков, нуклеиновых кислот, фосфолипидов и сахаров. Описываются закономерности влияния воды на биомолекулы, способствующие формированию нативной структуры.

Специально рассматривается проблема анализа характеристик водных растворов биомолекул в условиях гетерогенности. На ряде примеров показывается, каким образом можно получать информацию о трансформации структуры биомолекул и межмолекулярных взаимодействиях. Отмечается важность учёта наличия нанопузырьков газа, которые являются частью любого водного раствора.

Проводится краткий обзор методов исследования водных растворов биомолекул. Методы разбиваются на группы по принципу общности предоставляемой ими информации. Отдельно рассматриваются три метода, которые в диссертационной работе являются основными: ИК спектроскопия собственного излучения, метод динамического светорассеяния, терагерцовая спектроскопия временного разрешения.

В целом, литературный обзор, несмотря на большое разнообразие затронутых тем, полно и точно отражают современное положение дел и место диссертационной работы в вопросах молекулярной организации водных растворов биомолекул и организации исследований этих растворов физическими методами.

Вторая глава посвящена исследованию гидратации биомолекул методом диэлектрической спектроскопии в ТГц области частот с использованием техники временного разрешения. Развивается подход, который заключается в получении информации из сравнения спектров диэлектрической проницаемости водных растворов биомолекул и спектров диэлектрической проницаемости растворителя. Различия измеряемых диэлектрических характеристик интерпретируются в терминах структурной динамики воды и динамики образуемых водой гидратных оболочек биомолекул.

Для определения диэлектрической проницаемости водной фазы растворов биомолекул производится вычитание вклада биомолекул из диэлектрических спектров их растворов. Используются модели эффективной среды как стандартные (модели Максвелла Гарнетта и Бруггемана для случая растворов белков, АТФ, липосом и моносахаридов), так и те, которые

предлагаются и развиваются самим автором. Отдельный раздел посвящён теоретической разработке модели эффективной среды для растворов протяжённых биополимеров — ДНК и полисахаридов.

Вторая глава содержит теоретический раздел, в котором рассматриваются поляризационные процессы в растворе на молекулярном уровне для определения концентрации свободных молекул воды. Выводится соотношение, позволяющее рассчитывать процент свободных молекул на основе спектральных параметров диэлектрической проницаемости растворов в ТГц области частот. Для корректного вычитания диэлектрического вклада моносахаридов из спектров их растворов автором апробируется оригинальная методика стеклования сахара без его разложения. Этим устраняется вклад фоновых полос в определяемых диэлектрических спектрах сухих сахаров.

На основании разработанного подхода проводится анализ гидратации биомолекул разных типов. На примере модельного белка — бычьего сывороточного альбумина, БСА, — демонстрируются отличия молекулярной релаксации воды гидратных оболочек белка в различных конформациях, а на примере липосом из DPPC — особенности гидратации в зависимости от фазового состояния фосфолипида. Проводится оценка толщины гидратации липосом, которая оказывается неожиданно большой — более 5 нм в нижнем пределе. Обнаруживается влияние ионов  $Mg^{2+}$  на структурирование воды в гидратной оболочке АТФ, способствующее формированию повышенного количества водородных связей. Выделяются три области гидратации ДНК с отличающимися характеристиками. Анализируется гидратация сахаров. Проводится исследование моно- и полисахаридов одинакового состава, но с разными гликозидными связями стереоизомеров моносахаридов. Перекрёстным сравнением параметров выявляется набор гидратационных характеристик сахаров, частично совпадающих с известными и частично составляющих новизну.

Третья глава посвящена развитию метода ИК спектроскопии собственного излучения для применения её в изучении структур биомолекул

в растворах. Метод измерения спектров собственного излучения образцов известен, но он предполагает высокую температуру образца, что неприемлемо для исследования биомолекул. В диссертации разрабатывается подход, заключающийся в том, что вместо нагрева или другого возбуждения образца производится экранировка теплового фона окружения до уровня излучения абсолютно черного тела при температуре жидкого азота. Регистрация излучения проводится на ИК Фурье-спектрометре с использованием, охлаждаемого жидким азотом детектора. Описываются способы нахождения фокуса оптической системы спектрометра и определения области экранирования внешнего излучения. Проводится оценка глубины вакуума в спектрометре для устранения возможных артефактов излучения воздуха вблизи образца, описывается процедура подбора толщины слоя образца, излучение которого измеряется. Предпринимается попытка учета артефактов, связанных с излучением и поглощением окон кюветы при измерении спектров излучения растворов.

Разработанный метод эмиссионной ИК спектроскопии апробируется автором в исследовании структур нескольких биомолекул в растворах. С высокой спектральной точностью регистрируются спектры излучения белка БСА в водном растворе, с чёткостью наблюдаются известные в стандартной адсорбционной ИК спектроскопии полосы Амид-I и Амид-II. Измеряются спектры излучения липосом DMPC в дейтерированной воде при двух фазовых состояниях фосфолипида. Наблюдается правильный сдвиг максимума полосы излучения C=O групп в сторону меньших частот при переходе от фазы гель к жидкокристаллической фазе. Регистрируется спектр излучения АТФ в воде в средней ИК области частот, содержащий более 20 полос, каждая из которых дублирует положение полос в спектре излучения.

Результаты, полученные методом эмиссионной спектроскопии, рассматриваются автором как доказательство работоспособности развиваемого им метода и возможности расширенного применения метода для исследования структуры биомолекул в водных растворах по аналогии с

методом измерения спектров «на просвет». Автор обсуждает преимущества предлагаемого метода, основными из называет неинвазивность и повышенную чувствительность.

Четвертая глава посвящена изучению характеристик гетерогенности растворов биомолекул. Речь идёт о распределениях биомолекул по размерам в растворе. Используется метод динамического светорассеяния. Демонстрируется возможность на основе рассмотрения распределений по размерам проводить анализ происходящих изменений с биомолекулами в растворе. Демонстрируются проявления олигомеризации, агрегации, реагрегации и денатурации белков, дробления и слияния липосом и др. На основе опыта в сфере гранулометрического анализа жидких коллоидных систем автором проводится обобщение литературных и собственных данных.

Специально отмечается, что растворы биомолекул могут содержать гетерогенности не только, собственно, биомолекул, но и пузырьков воздуха с размерами в области сотен нанометров, что чревато артефактами. Автором предлагается методика выявления пузырьков, позволяющая отличать их от биомолекул путём анализа соотношения параметров рассеяния раствора биомолекул и растворителя. Кратко рассматривается вопрос возможности формирования агрегатов пузырьков с биомолекулами на примере раствора иммуноглобулина G.

Оригинальные главы 2-4 составляют целостное исследование структуры биомолекул в водных растворах, выполненное с применением нескольких экспериментальных методик. Целостность достигается ясным пониманием автором биологических проблем, с одной стороны, и с другой стороны — хорошим знанием физики базовых молекулярных процессов и свободным владением современной экспериментальной техникой. В названных трёх компонентах, автор демонстрирует высокие квалификацию, эрудицию, целеустремлённость и тщательность проведения исследований.

Диссертационную работу завершают заключение и выводы, которые полностью соответствуют цели работы и вынесенным на защиту положениям.

Замечания по работе следующие.

1. В третьей главе описывается предлагаемый автором вариант эмиссионной ИК спектроскопии с использованием холодного фона. Заключение о применимости метода к исследованию структур биомолекул в растворах делается на основании всего трёх примеров. Метод технически сложный и для полной убедительности приведённых примеров кажется мало.

2. В третьей главе утверждается, что амидные полосы БСА в спектре излучения свидетельствуют о том, что вторичная структура белка состоит в основном из альфа-спиральных участков с небольшим вкладом неупорядоченных клубков и практически не содержит бета-слоёв. Утверждение сопровождается единственной ссылкой. Логика расшифровки требует большей аргументации.

3. В главе 2 проводится исследование гидратации различных биомолекул на основе сравнения характеристик водной фазы их растворов и растворителя. Подход основан на гипотезе о двухфазности раствора биомолекул. В то же время, глава 4 содержит утверждение об обязательном существовании нанопузырьков в водных растворах. Даже предлагаются методы учёта фракции пузырьков, мешающих регистрации биомолекул. Вопрос состоит в том, почему наличие нанопузырьков не учитывается автором в моделях эффективной среды, почему в расчётах не принимается во внимание наличие третьей фазы.

4. На фоне всестороннего и тщательного обсуждения литературных данных в первой главе, не столь выигрышно представляются автором собственные результаты в главах 2-4, и даже в выводах диссертации. Слишком одинаковыми и трудноразличимыми выглядят графики на рисунках 2.8, 2.11, 2.15, 2.18, 2.23. Туманно сформулирован вывод 6, в котором заключается, что ДНК оказывает влияние «аналогичное», но «более сильное».

Отмеченные замечания относятся к категории дискуссионных и не умаляют общей значимости диссертационной работы.

Результаты, полученные в диссертации, являются оригинальными и обладают безусловной новизной. Выводы естественным образом следуют из содержания диссертации, аргументированы и соответствуют цели и задачам работы. Достоверность результатов не вызывает сомнений. По материалам диссертации опубликовано 54 статьи в рецензируемых профильных научных изданиях, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Результаты неоднократно докладывались на научных конференциях и семинарах. По результатам диссертационной работы получены 3 патента на изобретения. Автореферат соответствует тексту диссертации, отражает все её этапы и полученные результаты.

По совокупности характеристик диссертация Н.В. Пенькова соответствует специальностям 1.5.2. – «Биофизика» и 1.1.10 – «Биомеханика и биоинженерия» (по физико-математическим наукам) и критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, она оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Считаю, что работа Н.В. Пенькова отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к докторским диссертациям, а соискатель Пеньков Никита Викторович заслуживает присуждения ему ученой степени доктора физико-математических наук по специальностям 1.5.2. – «Биофизика» и 1.1.10 – «Биомеханика и биоинженерия».

Официальный оппонент:

доктор физико-математических наук, профессор  
главный научный сотрудник, Отдел субмиллиметровой спектроскопии,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный

исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова  
Российской академии наук»

Волков Александр Александрович  
05 декабря 2022 г.

Контактные данные:

тел.: +7(499) 503-87-77, доп. 4-77, e-mail: aavol@bk.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация: 01.04.07 – Физика конденсированного состояния

Адрес места работы:

119991 ГСП-1, г. Москва, ул. Вавилова, д. 38,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный  
исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова  
Российской академии наук» (ИОФ РАН), Отдел субмиллиметровой  
спектроскопии

Тел.: +7(499) 503-87-77, доп. 4-77, e-mail: office@gpi.ru

Подпись сотрудника ИОФ РАН Волкова А.А. удостоверяю:

Заместитель директора

по научно-организационной работе,

ВРИО ученого секретаря ИОН РАН, д.ф.-м.н.

Глушков В.В.

05.12.2022 г.