

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию 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 биоинженерия»

Диссертационная работа Н.В. Пенькова посвящена исследованию молекулярной организации водных растворов биомолекул. Рассматриваются базовые аспекты строения растворов биомолекул: структура биомолекул, гидратация, характеристики гетерогенности растворов биомолекул. Показываются взаимосвязи этих аспектов друг с другом на множестве примеров для различных типов биомолекул, тем самым в работе формируется обобщённое понимание молекулярной организации водных растворов биомолекул как единой системы. Как правило, рассмотрение каждого из трёх выделенных аспектов проводится отдельно от остальных, при этом упускается из вида множество факторов, имеющих важнейшее значение. В особенности это относится к исследованию динамических гидратных оболочек биомолекул, характеристики которых зависят от множества структурных факторов гидратированных биомолекул, многие из которых до сих пор не поняты. В связи с этим выбранная тема диссертационной работы является глубоко фундаментальной с выраженной актуальностью.

Диссертация состоит из введения, четырёх глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 210 страницах, включает 55 рисунков и 11 таблиц. Библиография включает 555 источников.

Во Введении к диссертации рассматривается сущность проблем, на решение которых направлено исследование. Обосновывается их научная

значимость. Сформулированы цели и задачи исследования. Отмечена научная новизна работы, её теоретическая и практическая значимость. Приводятся положения, выносимые на защиту.

Первая глава является классическим вариантом обзора литературы, вводит в тему исследования и позволяет понять место работы в мировой науке. В данной главе проведён обзор накопленных научных знаний и применяемых методов исследования структуры водных растворов биомолекул.

Во второй главе описан исследовательский подход, позволяющий изучать гидратацию биомолекул в избыточном водном окружении, то есть в состоянии водных растворов. В основе этого подхода лежит метод ТГц спектроскопии временного разрешения. Определяемые спектры комплексной диэлектрической проницаемости растворов биомолекул сравниваются с аналогичными спектрами растворителей, из чего извлекаются параметры межмолекулярной организации воды, входящей в гидратную оболочку биомолекул. Данный подход был применен для изучения гидратации биологических молекул всех основных типов: белков, фосфолипидов, ДНК, сахаров. Получено множество новых данных и вскрыта специфика гидратации различных типов биомолекул. Показаны существенные различия в молекулярных релаксационных параметрах гидратной воды в зависимости от конформации белка. Для фосфолипидов показано сильное изменение межмолекулярной связанности в гидратной оболочке в зависимости от фазового состояния. Установлены три типа гидратации ДНК и показана кооперативность гидратации ДНК. Для сахаров наблюдается ослабление всех анализируемых параметров гидратации при переходе от моносахаридов к полисахаридам. Показаны отличия степени связанности воды в гидратных оболочках полисахаридов с различными гликозидными связями, а также влияние ориентации ОН-групп моносахаридов на распределение энергий водородных связей в гидратных оболочках. Были выделены и некоторые

общие закономерности гидратации биомолекул. Так, для большинства биомолекул показано, что помимо первичной гидратной оболочки с сильно связанными молекулами воды на поверхности, проявляется и более отдалённая область гидратации с ослабленным межмолекулярным связыванием и большим содержанием свободных молекул.

Важно отметить, что в Главе 2, помимо экспериментальных данных, также имеется теоретический раздел, посвящённый разработке модели эффективной среды для двухфазных сред с нитевидными включениями. На примере раствора ДНК подтверждено, что эта модель применима для водных растворов фибриллярных биомолекул. Полученная модель эффективной среды используется в работе для исследования гидратации ДНК и полисахаридов. Совокупность теоретических и экспериментальных подходов, разработанных и применяемых автором диссертации, демонстрирует зрелость и глубину проведённого исследования.

Третья глава посвящена разработке метода ИК спектроскопии собственного излучения, применимого для исследования структуры биомолекул в растворе. Данный тип спектроскопии позволяет получать характеристические спектры анализируемых молекулярных объектов, аналогичные классическим спектрам поглощения, при этом обладает некоторыми преимуществами. Во-первых, это абсолютно неинвазивный метод анализа, поскольку не требуется воздействие на образец. Также показано достижение более высокой чувствительности, по сравнению с абсорбционной спектроскопией. Описанный метод принципиально отличается от всех использованных ранее аналогов ИК спектроскопии тем, что он не нуждается в возбуждении образца. Регистрируемая энергия излучения с характерными частотами молекулярных колебаний является преобразованием тепловой энергии вещества. Продемонстрирована применимость описанного метода спектроскопии собственного излучения

при анализе вторичной структуры белка, структуры АТФ, фазового состояния фосфолипида, находящихся в водных растворах.

В Главе 4 рассматривается вопрос гетерогенности водных растворов биомолекул. Показано, что данный аспект является намного более сложным, чем считалось ранее. Помимо того, что биомолекулы в различных условиях могут изменять свои размеры и формировать различного рода комплексы, что приводит к изменению распределений по размерам, собственно, биомолекул, также в структуре раствора присутствует размерная фракция другой природы – спонтанно образующиеся пузырьки воздуха. Данный объект последние годы широко изучается, а в данном разделе диссертации описан весомый вклад автора в эти исследования. Например, были определены размеры и концентрации пузырьков в растворах различного состава, изучено влияние внешних воздействий, таких как электролиз, перемешивание без разрыва жидкости, ударное механическое воздействие с разрывом жидкости. Показана возможность формирования стабильных агрегатов белка с пузырьками. В данной главе также рассмотрен один широко распространенный артефакт, сопутствующий анализу распределений по размерам биомолекул в растворах с помощью метода динамического светорассеяния. Фракция пузырьков из субмикрометрового диапазона может искажать распределение по размерам биомолекул в растворах. Описан подход, который, на основе сравнения интенсивностей рассеяния субмикрометровой фракции и интегральной интенсивности рассеяния буферного раствора, позволяет выявить фракцию пузырьков. Этот простой алгоритм позволит устранить описанную проблему во множестве исследований.

Оценивая в целом диссертацию Н.В. Пенькова, обращает на себя внимание большой объем экспериментальных данных и проработка деталей каждого эксперимента. При этом автор почти не прибегает к стандартному использованию экспериментальных методов. Для решения каждой

поставленной задачи разрабатывался особый подход, наиболее подходящий в соответствующем случае. Разработанные в диссертационной работе методы исследования на основе ТГц спектроскопии временного разрешения, ИК спектроскопии собственного излучения и динамического светорассеяния могут быть использованы и в других исследованиях. В ряде случаев, помимо эксперимента, автор прибегал к теоретическим исследованиям, что позволяло реализовать наиболее полное решение поставленных задач.

Результаты диссертационной работы, отраженные в выносимых на защиту положениях, являются оригинальными. Заключение и сделанные выводы полностью вытекают из результатов, аргументированы и соответствуют цели и задачам работы. Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации. По материалам диссертации опубликовано 54 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Также результаты работы были представлены на множестве научных конференций. Обоснованность и достоверность научных положений и выводов диссертационной работы не вызывает сомнений.

Представленная диссертационная работа, однако, не вполне свободна от некоторых недостатков, а также оставляет определенные вопросы:

1. При изучении гидратации АТФ в главе 2 используются растворы АТФ и $MgCl_2$ с концентрациями 40 мМ. Полученные данные интерпретируются в контексте биологической значимости. При этом реальные внутриклеточные концентрации Mg^{2+} и АТФ значительно меньше указанных. Можно ли с такими отклонениями по концентрациям делать выводы о биологической значимости?

2. Также на странице 105 имеется утверждение о том, что «практически во всех биологически значимых реакциях участвует именно комплекс $Mg \cdot АТФ$ », а не АТФ. При этом нет соответствующих ссылок, подтверждающих это.

3. В диссертации используется множество раз термин «спектроскопия», хотя речь идёт в точном академическом смысле этого слова о спектрометрии.

4. Также для системы липида в воде используется термин «суспензия липосом», при этом с точки зрения коллоидной химии это эмульсия фосфолипида в воде, а не суспензия.

5. Получено множество данных о нанопузырьках в растворах, в том числе, в присутствии биомолекул. При этом совершенно не раскрыт и даже не затрагивается вопрос о роли нанопузырьков внутри живой клетки, что может быть важным для биофизики.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.2. – «Биофизика» и 1.1.10 – «Биомеханика и биоинженерия» (по физико-математическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова."

Таким образом, соискатель Пеньков Никита Викторович заслуживает присуждения ученой степени доктора физико-математических наук по специальностям 1.5.2. – «Биофизика» и 1.1.10 – «Биомеханика и биоинженерия».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,

главный научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией функциональной микроскопии биоструктур, Федеральное государственное бюджетное учреждение

науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Погорелов Александр Григорьевич

Контактные данные:

тел.: 7(4967)739370, e-mail: agpogorelov@rambler.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.00.02 – «Биофизика»

Адрес места работы:

142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН), лаборатория функциональной микроскопии биоструктур
Тел.: 7(4967)739370; e-mail: agpogorelov@rambler.ru

Подпись сотрудника ИТЭБ РАН Погорелова А.Г. удостоверяю:

Ученый секретарь ИТЭБ РАН, к.б.н.

Т.А. Перевязова
07.12.2022