

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
биоинженерия»

Диссертационная работа Пенькова Никиты Викторовича посвящена исследованию водных растворов биологических молекул с целью развития понимания молекулярной организации биополимеров, надмолекулярных структур и малых биологически активных соединений во взаимодействии с окружающими молекулами воды, поскольку только в условиях взаимодействия с водой осуществляется функционирование биосистем.

Актуальность избранной темы – состояния воды и ее роли в организации и функционировании живых и модельных систем является горячей темой в течение многих лет. Это хорошо иллюстрируется сравнением количества файлов с названиями структура воды, структура ДНК или структура белков в поисковой системе Google, где количество файлов о воде кратно превышает количество файлов о важнейших биологических макромолекулах. Основным методом избран метод терагерцовой спектроскопии - чувствительный к межмолекулярной структуре и динамике свободной и связанной воды. Эта частотная область электромагнитного спектра наименее изучена из-за технических трудностей, тем ценнее работы, проводимые в этой области. Вода очень сложный объект потому важным аспектом является изучение ее имманентной гетерогенности, чему посвящена другая существенная часть диссертационной работы.

Научная новизна. Детально разработан метод измерения диэлектрических характеристик водных растворов в терагерцовой области частот. В частности, использование метода измерения двух идентичных кювет с различной толщиной раствора, контролируемой измерениями интерференционной картины в ИК спектрометре, дегазация образцов перед измерениями и

стабилизация температуры с точностью $0,1^{\circ}$, позволило избежать часто возникающих оптико-спектральных артефактов. Построена модель диэлектрической эффективной среды для растворов, содержащих фибриллярные молекулы. Получены новые данные о состоянии воды в растворах низкомолекулярных и высокомолекулярных биологически активных веществ, фосфолипидных липосом.

На примере гидратации АТФ было показано, что связывание с ионами Mg^{2+} приводит к принципиально иному типу гидратации, чем без Mg^{2+} . Это коррелирует с ролью комплекса $Mg \cdot АТФ$ в биологии, как основного субстрата в большинстве реакций с участием АТФ.

Разработан метод ИК спектроскопии излучения с холодным фоном и показана его эффективность в регистрации ИК спектров различных растворов при комнатной температуре без использования зондирующих источников излучения.

Предложен метод идентификации нанопузырьков в водных растворах с использованием метода динамического рассеяния света.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, подтверждается статистической обработкой многократно повторенных экспериментов с использованием высококласной аппаратуры, а также чистых химических реактивов. По материалам диссертации опубликовано более 50 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Результаты неоднократно докладывались на научных конференциях и семинарах.

Автореферат соответствует содержанию диссертации и отражает все основные аспекты работы.

Диссертационная работа содержит введение, основную часть, состоящую из четырех глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы из 555 источников, списка собственных публикаций и патентов на изобретения.

В первой главе представлен анализ работ по изучению гидратации биологически активных соединений различными физическими методами. Обсуждены особенности результатов, полученных на разной временной шкале. Описаны процессы, приводящие к изменению гетерогенности растворов биомолекул, в том числе появление газовых нанопузырьков. Подробно описан квазиоптический метод терагерцовой спектроскопии в применении к водным растворам.

Во второй главе подробно проанализированы технические детали терагерцовой спектроскопии, диэлектрические характеристики гетерогенных образцов. Разработана новая модель эффективной диэлектрической среды, содержащих протяженные биополимеры, а также новый общий подход к изучению гидратации по спектральным характеристикам водных растворов в терагерцовом диапазоне. Из спектров растворов биомолекул исключается вклад «сухих» молекул с использованием разработанной диссертантом модели эффективной диэлектрической среды для длинных молекул. Полученные спектры действительной и мнимой составляющих диэлектрической проницаемости характеризуют состояние воды в изучаемых образцах. Для интерпретации полученных спектров в области 10 - 100 ТГц используется разложение нехарактеристичного спектра комплексной диэлектрической проницаемости на два релаксационных процесса и высокочастотный колебательный с учетом электропроводности раствора.

Предложенным методом исследованы растворы сывороточного альбумина быка при разных значениях pH, однослойные липосомы из фосфолипидов в различных фазовых состояниях, АТФ в воде и АТФ в присутствии ионов Mg, плазмидная ДНК в присутствии ионов Mg и K, а также сахаров разного типа: моно- и полисахаридов, заряженных и нейтральных, стереоизомеров. На примере гидратации АТФ было показано, что связывание с ионами Mg^{2+} приводит к принципиально иному типу гидратации, чем без Mg^{2+} . Это коррелирует с ролью комплекса Mg·АТФ в биологии, как основного субстрата в большинстве реакций с участием АТФ. Для ДНК было показано,

что наличие ионов K^+ во внутриклеточных концентрациях способствует снижению всех анализируемых гидратационных свойств ДНК по сравнению со случаем гидратации без ионов или при наличии Mg^{2+} . Это говорит о возможном влиянии внутриклеточного K^+ на ДНК через его гидратную оболочку.

Установлены изменения гидратации при конформационных переходах белка, зависимость гидратации от фазового состояния липидов в составе липосом и строения молекул сахаров. Наиболее тщательно изложены результаты исследования сахаров с указанием достоверных интервалов на исходных экспериментальных спектрах.

В третьей главе описан разработанный автором метод измерения ИК спектров собственного излучения биологических молекул в растворах с использованием холодного фона. Данный метод не использовался ранее и может представлять интерес не только применительно к изучению биологических молекул, но и образцов любого типа. На сконструированной установке были измерены спектры излучения белка БСА, фосфолипидных липосом в двух фазовых состояниях и АТФ в водных растворах. Существенной особенностью метода является то, что измеряется именно собственное излучение, не требующее внешнего источника возбуждения. Он особенно интересен в связи с тем, что на сегодняшний день недостаточно изучены эффекты влияния ИК излучения на водные растворы и биообъекты. Разработанный метод является абсолютно неинвазивным, в чём заключается его уникальность.

В четвертой главе водные растворы биологических молекул рассматриваются с точки зрения характеристик гетерогенности, точнее, распределений по размерам, регистрируемым методом динамического рассеяния света. Обнаружено, что даже чистая вода или солевые растворы, заведомо не содержащие коллоидных частиц, демонстрируют наличие фракций с размером порядка сотни нанометров при проведении высокочувствительных измерений. Установлено, что субмикронная фракция относится к нанопузырькам. Показано, что эту фракцию можно устранить математически,

перейдя от распределений по интенсивности к распределениям по объёму или числу частиц, в которых фракции, например, белков, с меньшим размером более выражены.

Исследовано влияние различных неорганических ионов на размер и числовую концентрацию нанопузырьков в растворе и показано, что средний гидродинамический диаметр нанопузырьков в растворах разных солей лежит в диапазоне 100-600 нм. Тип ионов влияет также на числовую концентрацию пузырьков, которая варьирует от 10^6 до 10^7 см⁻³. Нанопузырьки образуются в водных растворах на магнитной мешалке и в ходе электролиза с последующей эволюцией размеров. Установлено, что размер порядка сотни нанометров является равновесным для пузырьков в водных растворах. Макромолекулы в растворах, в частности белки, могут образовывать комплексы с пузырьками, а характеристики гетерогенности белковых растворов после механического воздействия могут существенно меняться.

В заключении представлены основные результаты проведенных исследований и выводы. Отмечается, что приведённые примеры сахаров и ДНК демонстрируют явную связь характеристик гетерогенности их растворов не только со структурой самих биомолекул, но и со свойствами гидратации.

Выполненная диссертационная работа Пенькова Н.В. актуальна, её результаты имеют практическое значение, однако к работе **имеется ряд замечаний.**

Разложение не характеристичного спектра комплексной диэлектрической проницаемости в области 10- 110 ТГц следует предложенному в работе Yada, Nagai, Tanaka (2008) и повторенному в ряде других работ, но в обзоре отсутствует обсуждение этого подхода. Не проанализирована возможность описания низкочастотной области терагерцового спектра другими функциями распределения с несимметричными крыльями. При условии наличия двух дискретных состояний воды уместно было бы обсудить наличие бифуркатных водородных связей, но они даже не упоминаются, хотя ссылка на

основополагающую работу Н.А. Чумаевского и М.Н. Родниковой существует в списке литературы.

Процедура фитинга экспериментальных кривых по 6 параметрам подробно описана, однако оставляет недоумение сравнение кривых на рис. 2.8 и рассчитанных данных в табл.2.1. На рисунках при значениях рН 2,5; 6; 8; и 10 диэлектрическая проницаемость водного раствора без белка лежит ниже, чем в растворе с белком, а при рН 4,2 ситуация обратная. В то же время в таблице 2.1 величины $\Delta\epsilon_1$ в растворах БСА при всех значениях рН всегда ниже, а $\Delta\epsilon_2$ всегда выше при практически неизменных остальных параметрах.

Вопрос аналогичный сформулированному выше для белков возникает также при сопоставлении рис.2.11 и табл. 2.2 для суспензии липосом. При температуре 30⁰С частотные зависимости диэлектрической проницаемости в суспензии липосом и буферном растворе сильно отличаются, особенно в области низких частот. По результатам расчетов именно низкочастотные компоненты двух растворов одинаковы, но изменяются характеристики высокочастотного колебательного процесса, частота которого лежит вдвое выше по частоте за пределом изучаемого графика. Уменьшение частоты высокочастотных колебаний в суспензии должно было бы приводить к увеличению ϵ , но картина прямо противоположная. Правда расчет дает значительное уменьшение амплитуды колебаний. При температуре 40⁰С вся ситуация меняется на прямо противоположную.

В отличие от вышесказанного, исходные спектры, представленные на рис. 2.18 и содержащие погрешности, качественно непротиворечивы с результатами расчетов, приведенных в табл.2.4.

При исследовании суспензии липосом в процедуре фитинга добавлено еще одно уравнение, позволяющее использовать известное значение статической диэлектрической проницаемости $\Delta\epsilon_s$, что что позволяет уменьшить число варьируемых параметров на единицу и однозначно определять величину $\Delta\epsilon_1$. Возникает вопрос, почему это не было сделано при анализе других растворов?

При обсуждении размеров гидратной оболочки около липосом, автор справедливо отмечает ее размер, значительно превышающий молекулярные размеры, приходя к выводу о кооперативных эффектах в образовании гидратного слоя. При этом вовсе не упоминается дальнедействующие силы Ван дер Ваальса между макроскопическими телами, приводящими к увеличению притяжения на больших расстояниях, что следует учитывать при рассмотрении коллоидных систем и давно описано в литературе.

Не обосновано использование уравнения Максвелла-Гарнетта для анализа растворов АТФ с объемной долей много меньше 1. Расчеты могли быть существенно проще. Присутствие АТФ в воде сказывается на значимом уменьшении $\Delta\epsilon_1$, видимом только на кривой потерь, но не действительной части. В растворе $MgCl_2$ с АТФ потери меняются достоверно в диапазоне 50-90 cm^{-1} , но рассчитанные изменения касаются лишь увеличения амплитуды колебаний на частоте, лежащей далеко за пределами графика.

Не на всех рисунках этой главы даны правильные обозначения осей ординат.

Показано, что разработанный метод эмиссионной ИК спектроскопии с холодным фоном дает информацию аналогичную получаемой из спектроскопии ИК поглощения, но обладает существенно большей чувствительностью, особенно в низкочастотной области спектра. Сравнивая эти два метода, автор обходит вниманием необходимость иметь кроме жидкого азота еще и вакуумный ИК спектрометр, что значительно снижает практические возможности метода.

Высказанные замечания не меняют сделанных выводов и не снижают общую высокую оценку работы.

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 физико-математических наук, профессор
профессор кафедры биофизики физического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова

Лобышев Валентин Иванович

07 декабря 2022

Контактные данные:

тел.: +74959391687, e-mail: lobyshev@yandex.ru

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

Адрес места работы:

119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В. Ломоносова, дом 1,
строение 2, физический факультет, кафедра биофизики.

Подпись профессора В.И. Лобышева удостоверяю:

Ученый секретарь физического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова
профессор

В.А. Караваев