

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Гольшевой Елены Александровны «Малоугловые движения молекул по данным импульсного ЭПР и особенности молекулярной упаковки в биологических и неупорядоченных средах», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества

Диссертационная работа Гольшевой Е. А. посвящена экспериментальному исследованию методом ЭПР особенностей молекулярных движений различных биологических объектов и разупорядоченных сред при низких температурах. Работа представляет интерес прежде всего с точки зрения процессов криоконсервации, однако, изучение структурно-динамических особенностей важно и с фундаментальной точки зрения для детального понимания функциональных свойств белков и мембран.

Для исследования молекулярной подвижности в неупорядоченных средах и особенностей молекулярной упаковки может быть использован ряд методов, таких как ЭПР, ЯМР, рассеяние нейтронов, мессбауэровская спектроскопия, молекулярно-динамическое моделирование, комбинационное рассеяние света и др. Каждый из этих методов обладает своими преимуществами и недостатками, дополняя друг друга, они позволяют собрать более полную информацию об изучаемых системах. Диссертационная работа Гольшевой Е. А. в основном посвящена развитию применения импульсной ЭПР спектроскопии с использованием спиновых меток для получения информации о стохастических либрациях в различных молекулярных стеклах и биологических объектах и связи движений с надмолекулярной упаковкой, что и обуславливает **актуальность и практическую значимость** настоящей работы.

В качестве основных **научных результатов** диссертации можно отметить следующие. Полученные данные для различных спин-меченых молекул в модельных мембранах разного типа указывают на то, что малоамплитудные движения слабо зависят от типа молекулы, таким образом, движения являются кооперативными и определяются в основном молекулярной упаковкой. Установлено, что для внутренне разупорядоченного белка казеина температурная зависимость подвижности близка к таковой для модельных мембран DOPC, что говорит о коррелированной переупаковке сегментов белковой молекулы. Исследованы температурные зависимости стохастических молекулярных либраций для нескольких застеклованных глубоко-эвтектических растворителей (ГЭР) и показано, что эти температурные зависимости для растворителя холин хлорид – мочевины и для модельных мембран DPPC близки.

Диссертационная работа содержит введение, семь глав, раздел «Основные результаты и выводы», список сокращений и список литературы, состоящий из 187 наименований. Работа изложена на 133 страницах и содержит 42 рисунка.

Во введении автором обосновывается актуальность и разработанность темы, формулируются цели и задачи исследования.

Первая глава диссертационной работы посвящена обзору литературы и содержит три части. В разделе 1.1 обзора описаны некоторые типы молекулярных неупорядоченных сред: биологические и модельные мембраны, глобулярные и внутренне разупорядоченные белки, глубоко-эвтектические растворители. В разделе 1.2 описаны некоторые методы исследования молекулярной подвижности в неупорядоченных средах и ее связи с молекулярной упаковкой. Обсуждается явление динамического перехода и примеры его исследования при помощи методов рассеяния нейтронов, мессбауэровской и рамановской спектроскопии. Раздел 1.3 посвящён применению метода ЭПР в стационарном и импульсном вариантах с использованием спиновых меток и зондов для исследования подвижности различных биологических объектов и разупорядоченных сред, а также по выяснению её связи с особенностями надмолекулярной упаковки.

Во **второй главе** описаны используемые спиновые зонды и метки, приведены структуры спин-меченых стеариновых кислот и липидов. Описаны условия проведения экспериментов для ЭПР в стационарном и импульсном вариантах.

Третья глава диссертационной работы посвящена изучению стохастических молекулярных либраций для различных типов спин-меченых молекул, абсорбированных на поверхности наноразмерного порошка SiO_2 . Показано, что скорость анизотропной релаксации, обусловленная стохастическими либрациями, достигает максимума при определённой температуре с дальнейшим незначительным падением. Такое поведение удалось промоделировать в рамках модели случайных прыжков между близкими ориентациями по теории Жидомирова-Салихова. Было предположено, что максимальная скорость спиновой релаксации, наблюдаемая в спадах ЭСЭ, связана с появлением двухосного или одноосного движения молекул. Показано, что начало либрационных движений имеет место при температуре около 130 К для систем, в которых можно ожидать только изгибные движения. В то же время, если молекулы имеют достаточную свободу для крутильного движения, либрации появляются уже при температуре около 100 К.

В **четвёртой главе** обсуждается исследование температурного поведения стохастических либраций трёх зондов в липидных бислоях DPPC и POPC в гелевой фазе. Показано, что вне зависимости от выбора спинового зонда стохастические либрации в полностью насыщенных мембранах DPPC появляются вблизи 130 К, что свидетельствует о проявлении преимущественно изгибных колебаний в этих бислоях. В мембранах из ненасыщенных липидов POPC рост подвижности начинается с температуры 100 К, что, в свою очередь, можно связать с проявлением крутильных колебаний в мембранах с большей рыхлостью. Сходство данных для трех спин-меченых молекул, различающихся по химической структуре и локализации в мембранах DPPC, по-видимому, указывает на кооперативный характер молекулярных движений в этих липидных бислоях.

Пятая глава посвящена исследованию липидных бислоев DOPC в гелевой фазе и их сравнению с DPPC и POPC. Экспериментальные данные показали, что для DOPC значения скорости анизотропной релаксации, обусловленной стохастическими либрациями, находятся между значениями для POPC и DPPC, будучи ближе к случаю POPC при температуре ниже 130 К и к DPPC выше 170 К. При этом для образца DOPC/16-DSA обнаружен излом при 140 К, не наблюдающийся для системы DOPC/5-DSA. Было предположено, что при температуре выше 170 К происходит совместная упаковка концов хвостов DOPC за пределами двойной связи. При этом при низких температурах может происходить захват системы во множестве неглубоких энергетических ям. Выше температуры 160-170 К для всех трех исследованных бислоев (DOPC, POPC и DPPC) проявляются медленные вращения, что указывает на размягчение матрицы. Размягчение может способствовать формированию более энергетически выгодных конформаций липидов при температурах выше 160-170 К, что согласуется с предполагаемой переупаковкой в бислоях DOPC.

В **шестой главе** диссертации приведены данные по исследованию глобулярного белка лизоцима и внутренне разупорядоченного белка казеина. Установлено, что либрационные движения в гидратированном спин-меченом казеине-V возникают при меньшей температуре (100 К), чем в гидратированном спин-меченом лизоциме-V (130 К). Данный факт был объяснён тем, что разупорядоченный белок казеин обладает большей внутренней свободой движений при низких температурах. Однако, для спин-меченого гидратированного казеина-V вблизи 120 К наблюдается излом температурной зависимости, и уже при температуре выше 160 К его скорость релаксации ниже, чем спин-меченого гидратированного лизоцима-V. Такое поведение может быть обусловлено переупаковкой казеина с повышением температуры, когда структура становится более плотной и/или жесткой. Наблюдаемое сходство подвижности спин-меченого гидратированного лизоцима-V и бислоя DPPC, а также подвижности спин-меченого гидратированного казеина-V и бислоя DOPC выступило подтверждением высказанным предположениям.

В **седьмой главе** представлены результаты исследования двух переохлажденных ГЭР: холин хлорид – мочеви́на (релайн) и холин хлорид – тиомочеви́на – с использованием спинового зонда ТЕМПОН. Установлено, что ниже 254 К спектры ЭПР соответствуют иммобилизованным нитроксильным радикалам, в то время как выше 254 К появляется вклад от спектров характерных для вращательного движения ТЕМПОН, что говорит о сосуществовании твердой и жидкой фаз в исследуемых образцах. Установлено, что для ТЕМПОН в растворе холин хлорид – тиомочеви́на рост скорости анизотропной релаксации начинается при температуре 160 К, в то время как в релайне он более растянут по температуре и начинается при температуре 130 К. Полученный результат предполагает, что надмолекулярная упаковка раствора холин хлорид – тиомочеви́на более жесткая. Установлено, что температурная зависимость стохастических молекулярных либраций для системы DPPC/5-DSA и релайна с ТЕМПОН близки, что может говорить о схожей надмолекулярной упаковке.

В разделе «**Основные результаты и выводы**» сформулированы заключительные положения диссертационной работы.

Следует отметить, что **обоснованность, достоверность и новизна** результатов и выводов базируется на комплексе современных подходов ЭПР спектроскопии и широком наборе модельных мембран и спиновых зондов и меток, использованных в исследовании. Работа реализована на высоком уровне, диссертант уделил большое внимание теоретической и практической подготовке для проведения экспериментов по ЭПР спектроскопии в стационарном и импульсном режимах и анализа полученного набора данных. Хотелось бы отметить информативный литературный обзор в диссертации, который демонстрирует глубокое понимание проблемы автором.

Несмотря на то, что в работе нет существенных недостатков, которые бы могли бы препятствовать успешной защите, к тексту имеется несколько **замечаний и вопросов**.

1. В диссертации присутствует ряд опечаток и ошибок. Например, были найдены следующие: на стр. 11 указано, что список литературы состоит из 189 наименований, хотя их всего 187; в подписи к рис. 3.3 на стр. 52 упоминается уравнение (6.1), которого нет в работе; на стр. 69 присутствует ссылка на отсутствующие в тексте уравнения (30) и (31); на стр. 70 в «Исследование ЭСЭ спин-меченого лизоцима (предыдущая глава)», по-видимому, имеется в виду глава 6; на стр. 72 слово «бисолях»; на стр. 74 фрагмент «замороженные ионные жидкости»; на стр. 75 есть ссылка на отсутствующий в тексте рис. 25; на стр. 79 – на отсутствующий рис. 24; на стр. 85 «Несвязавшаяся» с прописной буквы; на стр. 92-94 есть ссылки на рис. 6.3 а, б или д, по-видимому, подразумевается рис. 6.3; на стр. 100 «ыс» вместо союза «с»; на стр. 104 бросается в глаза лишняя запятая в «возникает вследствие молекулярных»; на стр. 108 есть ссылка на отсутствующий рис. 4.

2. В работе не указаны погрешности для полученных скоростей анизотропной релаксации в двухимпульсных и трёхимпульсных экспериментах, что несколько затрудняет восприятие результатов. Какова, например, погрешность для графика отношения спадов, показанного на рис. 4.1 б? Данный график взят для примера ввиду высокого уровня шума.

3. В четвёртой главе при исследовании мембран DPPC используются три спин-меченые молекулы: TgTOAC1, 5-DSA и T-PCSL. Утверждается, что «ускорение температурной зависимости ΔW_{2-p} происходит начиная с температуры 130 К, что свидетельствует о проявлении преимущественно изгибных колебаний в этих бислоях». Однако, исходя из литературных данных для бислоев DPPC/16-DSA, приведённых на рис. 5.3, можно заметить, что наблюдается некоторое увеличение скорости релаксации в ряду DPPC/T-PCSL, DPPC/5-DSA, DPPC/16-DSA, при этом для DPPC/16-DSA рост начинается с температуры 105-115 К. Можно ли это трактовать как появление большей свободы для молекулярных движений вследствие того, что внутренняя часть мембраны является более неупорядоченной?

4. В главе семь утверждается, что в исследованных ГЭР отсутствуют структурные аномалии, найденные в ионных жидкостях. Могут ли они проявиться, если использовать другой спиновый зонд?

Сделанные замечания не являются принципиальными, не снижают ценности выполненного научного исследования и не уменьшают общего благоприятного впечатления.

Автореферат отражает основное содержание диссертации. Материалы диссертации опубликованы в восьми статьях в профильных международных изданиях и представлены на восьми российских и международных научных конференциях.

Считаю, что диссертационная работа «Малоугловые движения молекул по данным импульсного ЭПР и особенности молекулярной упаковки в биологических и неупорядоченных средах» соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в том числе отвечает критериям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в действующей редакции), а ее автор, Гольшева Елена Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

Официальный оппонент

Комаровских Андрей Юрьевич

кандидат физико-математических наук

специальность 02.00.04 – физическая химия

старший научный сотрудник лаборатории физико-химических методов исследования газовых сред

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт неорганической химии им. А.В. Николаева

Сибирского отделения Российской академии наук (ИНХ СО РАН)

630090, Россия, г. Новосибирск, проспект Ак. Лаврентьева, д.3

Тел. 8(383) 330 95 15.

Электронная почта: komarovskikh@niic.nsc.ru

23.08.2022

Согласен на включение моих персональных данных в документы, связанные с работой диссертационного совета, и их дальнейшую обработку.

Подпись Комаровских А.Ю. заверяю

Ученый секретарь ИНХ СО РАН

д.х.н.

29.08.2022



О.А. Герасько

