

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Елены Александровны Голышевой «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

Диссертация Е.А. Голышевой посвящена интересной и актуальной теме – исследованию стохастических ориентационных движений липидов, белков и глубоких эвтектических растворителей, содержащих смесь из доноров и акцепторов водородных связей. Основным методом исследования является метод регистрации стохастических либраций электронного спинового эха (ЭСЭ). Метод ЭСЭ позволяет изучать стохастические ориентационные движения парамагнитных молекул или отдельных фрагментов этих молекул. Исследования закономерностей движений парамагнитных молекул и изучение их температурных зависимостей необходимы для изучения наноструктурной молекулярной упаковки, которая во многом определяет функциональные свойства биологических макромолекул.

Конформационную подвижность белков и фосфолипидов изучали ранее различными методами, включая ЯМР, высокочастотную ЭПР-спектроскопию, импульсную спектрометрию и ряд других, а также с помощью молекулярно-динамического моделирования. В большинстве случаев эти исследования проводили либо при низких температурах, либо в высушенных трегалозных матрицах. Эти исследования показали, что при ограничении конформационной подвижности могут фиксироваться определенные конформационные субсостояния биологических макромолекул, между которыми происходят конформационные переходы при физиологических условиях. Таким образом, актуальность и научная значимость настоящей диссертационной работы обусловлена разработкой новых подходов к выяснению молекулярных механизмов функционирования биологических

Диссертационная работа состоит из семи глав, включая Введение, Экспериментальную часть, пять глав описания Результатов и Обсуждения, список сокращений и список литературы, состоящий из 187 наименований. Работа изложена на 133 страницах и содержит 42 рисунка.

В разделе Введение автор обосновывает новизну, значимость и актуальность темы диссертационной работы, а также формулирует основные цели и задачи исследования.

Глава 1 представляет собой Литературный обзор и состоит из трех разделов. В первом разделе описаны основные объекты исследования, включающие биологические и бислойные липидные мембраны, структурированные глобулярные и внутренне

неупорядоченные белки, а также глубокие эвтектические растворители (ГЭР). Второй раздел посвящен методам исследования молекулярной подвижности таких объектов и связи подвижности с характером надмолекулярной упаковки. В третьем разделе описаны различные методы ЭПР спектроскопии с применением спиновых меток и зондов. В этом разделе рассматривается феномен стохастических либраций и его связь с надмолекулярной упаковкой белков, фосфолипидов и ГЭР.

В **главе 2** кратко описана структура используемых в работе нитроксильных радикалов, спин-меченых стеариновых кислот и фосфолипидов, а также условия измерений стохастических либраций с помощью метода ЭСЭ.

Глава 3 посвящена исследованию молекулярной подвижности различных нитроксильных радикалов, спин-меченых пептидов и спин-меченых стеариновых жирных кислот на твердой поверхности оксида кремния. Было показано, что все изученные образцы можно разделить на два типа: в первом движения начинаются при $T \sim 100$ К, а во втором - при $T \sim 130$ К. Движения для спин-меченых стеариновых кислот наблюдались при температуре >100 К, что автор объясняет возникновением торсионных движений. Во всех других случаях молекулярная подвижность возникала при $T > 130$ К, что связано с изгибными движениями.

В **главе 4** описано исследование температурной зависимости стохастических либраций нитроксильных зондов в липидных бислоях фосфолипидов содержащих полностью насыщенные жирные кислоты (DPPC) и бислоях, содержащих ненасыщенные жирные кислоты (POPC). Продемонстрировано, что стохастические либрации в случае DPPC обнаруживаются при температурах около 130 К, а в случае POPC при температурах >100 К. Предположено, что в первом случае конформационная подвижность обусловлена преимущественно изгибными либрациями, а, во-втором – крутильными либрациями. Это различие автор объясняет большей рыхлостью бислоев, содержащих полностью насыщенные жирные кислоты (ЖК).

В **главе 5** сравниваются свойства бислоев DPPC (с полностью насыщенными ЖК) и POPC (с ненасыщенной связью в одной из двух ЖК), изложенные в предыдущей главе со свойствами, со свойствами липидных бислоев DOPC, содержащих ненасыщенные связи в обеих ЖК фосфолипидов. Температурная зависимость стохастических либраций для DOPC занимает промежуточное положение между DPPC и POPC, однако в этом случае при температуре 140 К наблюдается излом, который не наблюдается в двух других случаях. Исходя из этого наблюдения, автор делает предположение, что, межмолекулярная упаковка в бислое DOPC более упорядочена, чем в бислое POPC вследствие того, что дефектность бислоя DOPC снижается за счет параллельной укладки хвостов ЖК за пределами связей C=C.

В главе 6 приводятся весьма интересные данные по сравнению внутренне разупорядоченного белка казеина и классического глобулярного белка, имеющего определенную структуру - лизоцима. Показано, что конформационная подвижность лизоцима, регистрируемая по динамике обнаруживается при более высоких температурах (>130 K), чем подвижность казеина (>100 K).

В главе 7 представлены результаты исследования глубоких эвтектических растворов холин хлорид – мочевины и холин хлорид – тиомочевины – с использованием спиновых зондов. В исследуемых образцах продемонстрировано наличие твердой и жидкой фаз. Установлено, что упаковка холин хлорид – тиомочевины является более жесткой, чем упаковка холин хлорид – мочевины.

Среди результатов, полученных в диссертации, особенно интересным представляется обнаружение автором низкотемпературного разупорядочивания структуры исследуемых объектов, причём объектов различной природы (белки и модельные липидные мембраны). Хотя это обнаружение и не является первым, а следует за более ранним обнаружением того же явления на белках бактериального фотосинтетического реакционного центра, оно представляется важным шагом для дальнейшего развития представлений об этом явлении.

Полученные в диссертационной работе результаты являются достаточно надежными, новыми и достоверными. Работа выполнена на высоком методическом уровне с применением современных методов исследования и анализа полученных данных. Литературный обзор написан на хорошем уровне и свидетельствует о глубоких знаниях автора в данной области химической физики.

В работе есть некоторые незначительные погрешности.

1. Введение, стр. 5. Неудачная фраза: «вносит свои ограничения на исследуемые объекты»
2. Введение, стр. 8. Стилистически неудачное выражение: «понять механизмы малоугловых ориентационных движений – типа движений, внутренне присущим неупорядоченным средам»
3. Литературный обзор, стр. 13. Неточная формулировка: «В водной среде происходит самоорганизация липидов в липосомы». На самом деле в водной фазе липосомы образуются при различных воздействиях, обычно под действием ультразвукового дезинтегратора.
4. Литературный обзор, стр. 15: «Внутренне разупорядоченные белки выполняют различные функции, такие как передача сигналов и хранение небольших молекул». Непонятно, что значит «хранение молекул»

5. Результаты, глава 6, стр. 85. Казеин был растворен в буфере, содержащем «0.1 М буферного раствора Трис-НСl, рН=6». Эта фраза вызывает вопрос - каким образом можно работать в буфере Трис-НСl при рН=6, если рК этого буфера=8.1?

Перечисленные замечания не снижают ценности выполненной работы и общего впечатления от чтения диссертации, которая имеет много принципиальных достоинств.

Автореферат хорошо отражает содержание диссертации. Материалы диссертации опубликованы в виде восьми статей в ведущих высокоцитируемых международных журналах и представлены на многих 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 всем 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, Е.А. Гольшева, несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

Официальный оппонент

Алексей Юрьевич Семенов

доктор биологических наук, профессор по специальности 03.01.04 – биохимия,
заведующий отделом фотобиофизики

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,

119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40

Тел. 8(495) 939 3188,

Электронная почта: semenov@belozersky.msu.ru

23.08.2022

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

Подпись А.Ю. Семенова заверяю

Директор НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Академик РАН



В.Н. Сhtалцев