

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физического института имени П.Н. Лебедева Российской академии наук,

С.Ю. Савинов

«10» февраля 2017г.

## ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Федоровой Ксении Вячеславовны «Оптические свойства макромолекул белков и ферментов в водных растворах, содержащих металлические ионы», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 - оптика.

Диссертационная работа Федоровой К.В. посвящена экспериментальному исследованию растворов белковых молекул оптическими методами (рэлеевское рассеяние света и фотонно-корреляционная спектроскопия). В работе исследовалось влияние ионов металлов с большим ионным радиусом на водные растворы белков и ферментов, а также изучалась возможность использования методов светорассеяния для диагностики онкологических заболеваний.

Актуальность работы определяется, во-первых, тем, что взаимодействие белковых молекул, которое играет ключевую роль в функционировании биологических систем, чрезвычайно чувствительно к воздействию как наночастиц, так и ионов большого радиуса. Ионы металлов и их соединения, необходимые для нормальной жизнедеятельности организмов, при превышении допустимой концентрации оказываются токсичными. Механизмы происходящих при этом явлений на молекулярном уровне остаются до конца неясными. Поэтому настоящая работа актуальна с фундаментальной точки зрения. С практической точки зрения, работа актуальна как основа для разработки и модификации токсикологических методов.

Во-вторых, работа актуальна, поскольку её результаты, при их объединении с исследованиями сыворотки крови методами динамического рассеяния света, дополняют и уточняют методы ранней диагностики онкологических заболеваний и определения принадлежности пациента к группе риска по этим заболеваниям.

Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения и списка литературы из 132 наименований. Общий объем работы составляет 146 страниц.

Во введении обоснована актуальность выбранной темы диссертационной работы, приводится оценка состояния рассматриваемой проблемы, сформулированы цель и задачи исследований, основные положения, выносимые на защиту, научная новизна, и практическая значимость полученных результатов, представлен объем апробации результатов.

Глава 1 посвящена описанию методов исследований, использованных в работе. Рассмотрены вопросы их применимости к изучению агрегатов белков в водных растворах. Затронута проблема влияния анизотропии рассеивающих частиц на деполяризацию рассеянного света, и описан способ определения некоторых поляризационных свойств исследуемых объектов.



В главе 2 рассмотрены основные свойства белковых молекул и особенности их электростатических взаимодействий в водных растворах, как полиэлектролитов, в рамках теории Дебая-Хюккеля.

В главе 3 диссертации приводится обзор работ, посвященных исследованию трехкомпонентных систем (растворитель-вода + белок + металлический ион) с помощью оптических методов. Показана необходимость получения новых данных об агрегации молекул белков под воздействием металлических ионов, обладающих большими ионными радиусами.

Главы 4 и 5 посвящены описанию экспериментальных результатов, полученных лично автором за последнее десятилетие. В главе 4 исследуются оптические свойства молекул лизоцима при изменении таких параметров, как ионная сила раствора, концентрация белка, температура, кислотность среды. Подобные измерения были также выполнены для альбумина и  $\gamma$ -глобулина. Для фермента (лизоцима) такие исследования проведены впервые. Лизоцим выполняет в организме функции неспецифического антибактериального барьера. Механизм действия обусловлен способностью этого фермента нарушать клеточную стенку бактерий и вызывать их лизис (разрушение).

В работе впервые исследовано влияние концентрации и pH раствора на коэффициент деполаризации и оптическую анизотропию макромолекул лизоцима. Экстремумы этих pH-зависимостей лежат в области значений pH 3,5 – 4, а также экстремумы pH-зависимостей коэффициентов межмолекулярного взаимодействия, относительных масс рассеивающих частиц и коэффициентов трансляционной диффузии тоже лежат в этой области, в то время как ожидалось, что их положение совпадёт с изоэлектрической точкой (pH~10,5), как это происходит в белках. Автор предлагает объяснение такого несовпадения, основанное на нестабильности заряда на очень небольшой поверхности макромолекулы лизоцима.

Особенно интересным с точки зрения экологии и медицины в данной работе является изучение влияния на растворы белков ионов металлов.

Изучено влияние ионов металлов с большим радиусом ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ) на эффективную массу рассеивающих частиц водных растворов белков (альбумин,  $\gamma$ -глобулин, лизоцим и креатинкиназа), т.е. на образование их агрегатов и их поляризационные свойства. Показано, что увеличение таких агрегатов наиболее заметно проявляется для лизоцима в области pH 3,5-4, а для альбумина и  $\gamma$ -глобулина в области pH ~ 5–6, что совпадает с экстремумами pH-зависимостей коэффициентов межмолекулярного взаимодействия и коэффициентов трансляционной диффузии для лизоцима. Образование таких кластеров было визуализировано с помощью атомно-силового микроскопа.

В главе 5 приводятся экспериментальные результаты по исследованию растворов нативной и модельной сыворотки крови в норме и онкологической патологии. Выявлены диагностически значимые изменения усредненной массы рассеивающих частиц, второго вириального коэффициента и коэффициента трансляционной диффузии в сыворотке крови у онкологических больных и в модельных растворах, имитирующих кровь больного. При увеличении статистики результаты таких измерений, объединённые с результатами, полученными методами динамического рассеяния света в РОНЦ им. Н.Н. Блохина, создают реальную основу для надёжной ранней диагностики онкологических заболеваний и определения принадлежности пациента к группе риска по этим заболеваниям. Прикладное значение такой работы не вызывает сомнений.

В Заключении диссертации приводятся выводы, обобщающие результаты проведенных исследований, в соответствии с заявленными целью и задачами работы.



К наиболее интересным результатам работы следует отнести следующие:

- 1) Экспериментально методами светорассеяния показано отличие положения экстремумов рН-зависимостей ряда кинетических параметров растворов лизоцима от изоэлектрической точки, полученной электрофоретическими методами.
- 2) Определено положение иона  $\text{Eu}^{3+}$  и подтверждено положения ионов  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$  в ряду Хоффмейстера оптическими методами.
- 3) Предложена простая модель ионно-специфического эффекта на кластеризацию белков в водных растворах, содержащих ионы, которая была проверена экспериментально методами динамического рассеяния света и атомно-силовой микроскопии.
- 4) Предложен новый оптический метод ранней диагностики онкологических и некоторых хронических заболеваний по знаку вириального коэффициента.

К сожалению, представленный текст не свободен от недостатков.

- 1) В работе не определено, насколько общим для ферментов или для определенного класса ферментов является отличие положения экстремумов рН-зависимостей кинетических параметров растворов от изоэлектрической точки.
- 2) В диссертации не приведены результаты измерений водных растворов лизоцима в присутствии ионов металлов методами динамического светорассеяния, не представлено распределение интенсивности рассеянного света по размерам рассеивающих частиц в растворе.
- 3) Рассмотрение взаимодействия белковых молекул и ионов тяжелых металлов было проведено автором без учета специфических для каждого типа белка химических взаимодействий с этими ионами. В частности, игнорируется специфическое ковалентное взаимодействие ионов свинца и кадмия с серосодержащими аминокислотами. Из литературы известно, что подобные взаимодействия являются ключевыми при возникновении острой токсичности ионов тяжелых металлов.
- 4) Введение и автореферат не содержат отдельно сформулированной актуальности исследования. Во введении, при обосновании актуальности исследования, автор утверждает, что использование оптических методов, в том числе методов динамического рассеяния света для изучения структуры и поведения макромолекул в растворах, незначительно. Это утверждение не соответствует действительности, поскольку метод динамического рассеяния света на самом деле является одним из основных методов изучения поведения крупных молекул в водных растворах. Таким образом, актуальность данной работы оказывается недостаточно обоснованной.
- 6) В выводе «9» (стр. 132) допущена явная ошибка: между массой частиц, коэффициентом диффузии и интенсивностью рассеяния света не может отсутствовать корреляция.
- 5) В тексте имеется ряд случаев терминологической путаницы. Так на стр. 8 и еще в ряде мест вместо «ионов металлов с большим ионным радиусом» используется словосочетание «тяжелые металлы»; на стр. 9 автор использует «метод... доплеровского смещения скорости»; в подписи к рис. 3.1 фигурирует зависимость от рН, а на рисунке от  $Z$ . Непонятно, почему в названии Главы 5 присутствует слово «Приложение».

Однако указанные недостатки не влияют на общую положительную оценку работы в целом. Полученные в работе результаты обладают новизной, а диссертация представляет собой законченное исследование, содержащее интересные результаты. Основные результаты диссертации были представлены на 19 международных и российских конференциях,



семинарах, съездах и школах, и опубликованы в 7 статьях в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК. Автореферат диссертации достаточно полно отражает содержание диссертации, а выносимые на защиту положения соответствуют основным результатам.

Данные, полученные в диссертационной работе, вносят существенный вклад в оптические исследования белковых молекул, и представляют интерес для ряда научных коллективов, работающих над смежными проблемами в ИОФАН им. А.М. Прохорова, Российском химико-технологическом университете им. Д.И. Менделеева, Физическом институте им. П.Н. Лебедева, на Химическом факультете МГУ, ИХФ им Н.Н. Семенова РАН, Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, ИФАВ РАН, Институте спектроскопии РАН, РОНЦ им. Н.Н. Блохина и других организациях.

Диссертация Федоровой Ксении Вячеславовны «Оптические свойства макромолекул белков и ферментов в водных растворах, содержащих металлические ионы», удовлетворяет всем требованиям Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 - оптика.

Диссертационная работа Федоровой К.В. доложена и обсуждена на объединенном семинаре Оптического отдела им. Г.С. Ландсберга и Отдела люминесценции им. С.И. Вавилова и заседании Учёного совета Отделения оптики Физического института имени П.Н. Лебедева Российской академии наук.

Отзыв на диссертационную работу К.В. Федоровой рассмотрен и утвержден на заседании Учёного совета Отделения оптики Физического института имени П.Н. Лебедева Российской академии наук, протокол № 1 от 09.02.2017г.

Руководитель Отделения оптики  
Физического института имени П.Н. Лебедева  
Российской академии наук,  
доктор физико-математических наук

Владимир Сергеевич Лебедев

Отзыв подготовил:  
кандидат физико-математических наук,  
заведующий Лабораторией нелинейной  
оптики и рассеяния света ФИАН

Леонид Леонидович Чайков

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Физический институт имени П.Н. Лебедева Российской академии наук»  
119991, Москва, Ленинский проспект, д.53  
тел. +7 (499) 132-69-91, e-mail: [chaik@sci.lebedev.ru](mailto:chaik@sci.lebedev.ru)