

Отзыв официального оппонента  
на диссертацию Попова Антона Михайловича  
МИКРОФЛЮИДНЫЕ УСТРОЙСТВА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ И  
МЕХАНИЗМОВ ИХ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ НА ИСТОЧНИКЕ СИНХРОТРОННОГО  
ИЗЛУЧЕНИЯ

представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук  
по специальности 01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики

Кандидатская диссертация, как и любая научно-квалификационная работа, должна удовлетворять ряду определенных требований: актуальность, новизна, значимость, достоверность, обоснованность полученных результатов и выводов, их апробация в виде научных публикаций, докладов и т.д. А.М. Попов посвятил свою работу действительно важной и интересной теме – микрофлюидным устройствам (МФУ) для исследования структуры белков и механизмов их кристаллизации.

**Актуальность и важность** диссертации определяется тем, что исследование структуры и функции биологических объектов в настоящее время является одним из самых приоритетных направлений науки. Здоровье, долголетие, переход к персонифицированной медицине, проблемы экологии и многое другое напрямую зависят от фундаментальных знаний о строении элементарных «кирпичиков» живой материи – белков, нуклеиновых кислот, липидов, их комплексов, закономерностей их взаимодействия и функционирования. При структурных исследованиях используются разные подходы, но наиболее информативные – это восстановление структуры биологических объектов по данным дифракционной картины в кристаллах и в растворе. Эти два подхода являются взаимодополняющими: кристаллы дают возможность получить структуру вещества с практически атомным разрешением, а исследования в растворе позволяют проводить изучение биологических объектов в условиях наиболее близких к естественным и применять этот подход к объектам, которые не кристаллизуются или кристаллизуются только частично. Работа А.М. Попова посвящена разработке, описанию и испытанию в условиях реального эксперимента новых микрофлюидных устройств как для изучения структуры белковых растворов, так и для исследования механизмов формирования их кристаллов с возможностью последующего восстановления структуры высокого разрешения.

Необходимость разработки таких устройств абсолютно очевидна: так, например, те, кто исследует структуру различных веществ в растворе с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), сталкиваются с трудностями при измерениях, связанных с отсутствием ячейки, позволяющей работать с очень малым количеством исследуемого вещества. Капилляры, стеклянные или кварцевые, которые чаще всего используются в таких измерениях, помимо их дороговизны, требуют порядка 30 - 50 микролитров достаточно концентрированного раствора. Часто такое количество белка является просто недоступным. Кроме того, разборная, многоразовая, проточная ячейка значительно более удобна, экономична и позволяет расширить возможности эксперимента. Ячейки, представленные в диссертационной работе А.М. Попова, помимо данных преимуществ позволяют снизить объем исследуемого препарата в разы по сравнению со стандартными кварцевыми капиллярами, применяемыми в МУРР для изучения белковых растворов при сопоставимом соотношении сигнал/шум. То же самое

можно сказать и о микрофлюидных устройствах, разработанных автором диссертации и предназначенных для изучения процессов кристаллизации белков.

Следует отметить, что хотя в диссертационной работе А.М. Попова речь идет только о белках, как объектах исследования с помощью разработанных МФУ, эти устройства с очевидностью могут быть использованы значительно шире. Поэтому своевременность, актуальность и важность поставленных в диссертации А.М. Попова задач по разработке специализированных микрофлюидных устройств не вызывает сомнения.

Микрофлюидика (микрогидродинамика) в настоящее время является быстро развивающимся междисциплинарным направлением исследований, важной сферой применения которого является молекулярная и структурная биология. Именно применение возможностей и использование законов микрогидродинамики является тем, что определяет **научную новизну и практическую значимость** диссертационной работы А.М. Попова:

- были разработаны подходы к удешевлению и ускоренному изготовлению МФУ, в результате чего были созданы новые микрофлюидные устройства с ранее недоступными функциональными возможностями для научных исследований;

- используя разработанный и изготовленный автором микрофлюидный чип, впервые был проведен рентгеноструктурный анализ кристаллов белков лизоцима, аминотрасферазы из *Methanococcus vannielii* и эстеразы PMGL2 непосредственно в чипе;

- также впервые была продемонстрирована возможность *in situ* наблюдения динамики кристаллизации белков в микрофлюидных ячейках.

В целом, А.М. Поповым была разработана технологическая цепочка для оперативного прототипирования и создания разборных МФУ методами лазерной абляции и термической спайки. При этом была показана возможность многократного (до трёх раз) использования этих устройств. В результате автором диссертационной работы были созданы 2 ноу-хау и оформлена заявка на изобретение.

**Достоверность и обоснованность** содержащихся в работе научных положений и выводов была подтверждена воспроизводимостью результатов экспериментов с использованием разработанных микрофлюидных устройств, проведенных на различном лабораторном и измерительном оборудовании, в том числе на синхротронных источниках излучения, и сопоставлением полученных данных с уже известными результатами структурных исследований других авторов. Основные результаты диссертации были изложены в 5 научных статьях в рецензируемых журналах и докладывались на семинарах и конференциях.

Диссертационная работа А.М. Попова построена по классическому образцу: введение, литературный обзор, методическая часть, 3 главы с описанием полученных автором результатов, заключение, список литературы.

Достаточно широкий литературный обзор (156 ссылок) включает в себя критический анализ современного состояния вопроса и постановку задач диссертационного исследования. Диссертация хорошо и ясно иллюстрирована (74 рисунка). Каждая глава заканчивается краткими выводами. Написана хорошим научным и литературным языком на 149 страницах и в целом производит хорошее впечатление. Автореферат отражает содержание диссертации. Тем не менее, к диссертационной работе А.М. Попова имеется **ряд замечаний**:

1. Таблица 1 не несет никакой информационной нагрузки. Сравнение свойств (оптических, механических, термических и других) полимеров (не указано каких именно) и стекла (марка стекла тоже не указана) дается в терминах качественной оценки – отлично, хорошо, плохо и т.д. Здесь следует отметить, что современные полимерные материалы бывают как дорогими, так и дешевыми, прочными, термостойкими, обладающими химической стойкостью и другими самыми разнообразными свойствами и их следует оценивать количественно, приводя соответствующие технические характеристики, относящиеся к конкретным полимерным материалам. Аналогично при сравнении должно характеризоваться стекло.

2. С первым замечанием связано и второе. Для изготовления опытных образцов МФУ автор использует полиметилметакрилат (ПММА) и на странице 52 сравнивает его, также в основном качественно, с боросиликатным стеклом. Однако, существуют множество полимерных материалов (например, поликарбонат, полипропилен, лавсан и другие), которые имеют сопоставимую с ПММА стоимость и могут удовлетворять требованиям, которые формулирует в работе автор: пригодность к лазерной обработке и термическому бондингу, биосовместимость и пр. На наш взгляд следовало бы привести технические характеристики таких полимеров для сравнения с ПММА и показать возможность создания МФУ на альтернативной основе, что только бы украсило диссертацию.

3. При кристаллизации белков в каплях-микрореакторах в разработанных автором микрофлюидных чипах обнаружено, что кристаллы формировались, как правило, в одной трети сформированных капель, при этом в одной капле находился один кристалл, реже – два. Автор отмечает, что капли с большим числом кристаллов не подходят для проведения рентгеноструктурного анализа. Однако обнаруженная неоднородность в росте кристаллов в диссертации не обсуждается, хотя определенно нуждается и в обсуждении и в соответствующих выводах.

4. В работе имеются опечатки, ряд рисунков содержат одновременно и русские и английские надписи, есть неоправданные повторы – один и тот же текст приводится с небольшими изменениями в литературном обзоре и в других главах.

Однако указанные замечания носят скорее рекомендательный характер и не снижают ценности выполненных А.М. Поповым исследований и разработок. Представленная диссертационная работа является законченным, выполненным на высоком уровне научно-квалификационным исследованием. Диссертация Попова Антона Михайловича соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г. (ред. от 28.08.2017 г.), а ее автор заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики.

Официальный оппонент:

доктор химических наук

Штыкова Элеонора Владимировна,

ведущий научный сотрудник,

Лаборатория биоорганических структур,

Федеральное государственное учреждение

«Федеральный научно-исследовательский центр  
«Кристаллография и фотоника» Российской академии наук  
119333, Москва, Ленинский проспект, 59  
Тел. 8 (499) 135 4020, E-mail: eleonora.shtykova@gmail.com

Согласна на обработку персональных данных.

*МШ*  
20.02.2019г.

Подпись д.х.н. Э.В. Штыковой заверяю  
Ученый секретарь ФНИЦ «Кристаллография и фотоника»  
Российской академии наук»  
к.ф.-м.н. Л.А. Дадинова

