

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Беликова Евгения Александровича на тему «Атомное и электронное строение биогибридных материалов на основе бактериоферритина Dps», представленную на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности

1.3.8. Физика конденсированного состояния

Создание функциональных материалов с улучшенными характеристиками является приоритетным направлением физики конденсированного состояния. Перспективным подходом является разработка гибридных наноматериалов, сочетающих биологические и неорганические компоненты. Особый интерес представляет ферритинподобный белок Dps, молекулы которого характеризуются малыми размерами, высоким сродством к железу и способностью связываться с ДНК. Металл-оксидные ядра Dps перспективны для создания наночастиц железа и его оксидов, востребованных в различных практических областях, например в наноэлектронике и спинтронике. Отсутствие достоверных данных о механизме формирования, структуре и составе неорганических наночастиц малого размера, являющихся ядрами полых молекул белка Dps бактериального происхождения, структур на его основе, определяет **актуальность** данной работы. В диссертационной работе Беликова Е.А. были применены современные неразрушающие методы: электронная микроскопия высокого разрешения, рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (XPS), синхротронные методы спектроскопии рентгеновского поглощения XANES и фотоэмиссионной спектроскопии РЕЕМ. Взаимно дополняя друг друга эти современные физические методы позволили получить новые данные о морфологии, составе, атомном окружении и электронной структуре сложных объектов – биогибридных материалов на основе молекул белка бактериоферритина Dps получаемых из бактериальных клеток E.coli. Исходя из сказанного выше диссертационная работа посвящена решению востребованной задачи обладающей значительной **научной новизной**.

Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения и перечня использованной литературы. Материал представлен на 163 страницах, включает 72 рисунка. Список литературы охватывает 144 источника, среди которых присутствуют и статьи соискателя с результатами диссертационной работы.

Введение к диссертационной работе содержит обоснование значимости исследованной темы, поставленные в работе цели и задачи, обоснование актуальности предмета исследований, а также положения, выносимые на защиту. Приводится информация о научной новизне и практической ценности достигнутых результатов, публикациях и апробации работы.

Первая глава содержит систематизированные итоги углубленного изучения известных в литературе данных о биогибридных материалах, в том числе на основе белков ферритинов, затрагивает и источник молекул белка Dps – клетки кишечной палочки E.coli, что немаловажно, а также содержит примеры использования современных физических методов исследования для изучения такого класса объектов. Итогом анализа собранного материала является постановка цели исследования.

Вторая глава посвящена детальному описанию методик пробоподготовки образцов и используемых методов исследования, а также режимам работы и характеристикам оборудования, которое применялось в работе.

Результаты исследований биогибридных объектов молекул белка Dps с неорганическими наночастицами железо-кислород приведены в **третьей главе**. Методом криоэлектронной микроскопии высокого разрешения без контрастирования впервые получены экспериментальные данные, показывающие, что биологический контейнер для неорганических наночастиц в своём природном состоянии представлен белком Dps с внешними размерами порядка 10 нм и внутренней полостью размером около 7 нм, способные формировать квазиупорядоченные слои толщиной в одну молекулу. Методом просвечивающей электронной микроскопии показана специфика формирования неорганических наночастиц изученного биогибридного

материала. Метод спектроскопии рентгеновского поглощения XANES за $L_{2,3}$ краями железа позволил получить данные об электронной структуре и составе этих наночастиц, что подтверждено методом фотоэлектронной спектроскопии высокого разрешения. Выявлено, что ионы железа в различных зарядовых состояниях (Fe^{2+} и Fe^{3+}) составляют основу композиционной структуры неорганических наночастиц биогибридных материалов. Более того, экспериментально подтверждена возможность восстановления ионов до металлического состояния при использовании термической обработки в среде водорода или воздействия ионным пучком.

В **четвертой главе** автор приводит результаты исследований клеток (бактерий) *E.coli* как возобновляемого источника белка Dps. С использованием методов SEM и XPS высокого разрешения в сочетании с ионным травлением показана возможность получения молекул бактериоферритина Dps – основы биогибридного материала с ионами железа Fe^{2+} и Fe^{3+} без разрушения клеток, при многократном использовании клеток *E.coli* в режиме суперпродукции белка. Выполненные автором спектромикроскопические исследования методом PEEM с использованием лабораторных и синхротронных источников рентгеновского излучения позволили разработать методику и подтвердить возможность исследования подобных чувствительных биологических материалов химически селективным спектральным методом. Продемонстрирована устойчивость клеток к воздействию экстремальных условий сверхвысокого вакуума, воздействия электромагнитного излучения и высокого прикладываемого напряжения.

Заключительная **пятая глава** представляет отдельный практический интерес, поскольку в ней исследуется возможность интеграции молекул белка с развитой поверхностью объемной матрицы нитевидного кремния для производства материала с развитой функционализируемой поверхностью. Методами SEM и XPS в сочетании с ионным удалением части массива нитей кремния показано, что молекулы белка способны проникать вглубь матрицы. Удаление остаточных следов соли, формирующихся из исходного раствора белка, позволяет сохранить покрытие молекулами белка развитой

поверхности массива нитей. Полученные с помощью SEM и XPS взаимодополняющие результаты обеспечивают научную основу для дальнейшего создания технологий функционализации развитой поверхности кремниевых волокон путем управляемого нанесения биогибридного покрытия, что представляет значительный интерес для биомедицинских и биотехнологических применений.

К основным результатам, полученным диссертантом, и имеющим **научную значимость**, следует отнести:

1. В диссертационной работе предложены методологические решения для получения и подготовки образцов биогибридных систем на основе белка Dps клеток *E.coli*, включая пробоподготовку для исследований методами рентгеноэлектронной спектроскопии в высоком вакууме, в том числе с применением синхротронного излучения.
2. Впервые продемонстрирована интеграция белковых молекул бактериоферритина Dps с трехмерной структурой массивов кремниевых нитей, обеспечивающая функционализацию доступной поверхности по всей высоте массива. Установлено влияние остаточных солей на физико-химические свойства такой интегрированной системы и показана возможность их эффективного удаления при сохранении белкового покрытия.
3. Методами электронной микроскопии высокого разрешения без контрастирования в криогенных условиях впервые установлено, что нативная молекула белка Dps представляет собой природный контейнер с внешними размерами до 10 нм и внутренней полостью до 7 нм. Показано, что неорганические наночастицы внутри молекул Dps не подвергаются агрегации, а сами молекулы белка Dps способны самоорганизовываться в квазиупорядоченные монослойные структуры.
4. Установлено, что неорганические наночастицы в биогибридных материалах состоят из ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} , которые могут быть восстановлены до металлического состояния посредством термического воздействия в среде водорода либо ионной обработкой.

5. Предложен новый подход к изучению отдельных клеток *E.coli* методом фотоэмиссионной электронной спектроскопии (РЕЕМ) высокого разрешения с применением лабораторных и синхротронных источников излучения. Доказана устойчивость клеток к условиям эксперимента (вакуумирование, интенсивное облучение до 10^{12} фот./с продолжительностью до 10 часов, приложенное высокое напряжение до 12 кВ), что позволило продемонстрировать возможность многократного использования бактерий (клеток) *E.coli* в режиме суперпродукции для непрерывного получения белка бактериоферритина Dps, содержащего ионы Fe^{2+} и Fe^{3+} , без значительного повреждения клеточной структуры для создания биогибридных материалов.

Практическая значимость работы заключается в возможности применения полученных результатов для:

1. Контролируемого создания наночастиц оксида железа с заданными характеристиками: определенным размером, составом, атомной и электронной структурой.

2. Обеспечения стабильности свойств наноматериалов при длительном хранении и возможности их контролируемой модификации.

3. Экологически безопасного и экономически эффективного применения в различных областях:

- микроэлектронике и спинтронике;
- медицине и системах адресной доставки;
- функционализации развитых поверхностей и других технологических приложениях.

Достоверность и обоснованность основных научных положений и выводов диссертации обеспечивается применением современной приборной базы и методов, в том числе синхротронных, для исследования изучаемых объектов (просвечивающая электронная микроскопия, в том числе в криогенных условиях; сканирующая электронная микроскопия с энергодисперсионным элементным анализом; рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия; спектроскопия рентгеновского поглощения; фотоэмиссионная

электронная микроскопия и др.) и подтверждается взаимной дополняемостью и воспроизводимостью результатов и статистической обработки результатов измерений. В диссертации подробно изложены методики получения образцов, характеристики экспериментальных установок и процедуры выполнения измерений. Интерпретация результатов основана на общепринятых физических моделях. Представленные научные положения и выводы достоверны, что подтверждается независимыми экспертными оценками рецензентов научных журналов, входящих в перечень ВАК и индексируемых международными базами данных, в которых опубликованы статьи, содержащие основные результаты работы, обоснованы и согласуются с современными научными представлениями.

Изложенные в диссертации результаты прошли апробацию на конференциях международного и национального уровня. По теме диссертации автором опубликовано 7 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science, Scopus и рекомендованных ВАК, а также 38 тезисов докладов на конференциях. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

По диссертации можно сделать следующие **замечания**:

1. В работе отсутствует единый раздел с описанием полной методики получения наночастиц оксида железа в белке Dps и сводная таблица всех исследуемых в работе образцов.

2. Из текста диссертации остается непонятным механизм восстановления ионов железа при бомбардировке ионным пучком. Возможно, автор использует некорректный термин и увеличение интенсивности спектральной компоненты Fe^0 не соответствует химическому процессу восстановления. Также по тексту встречаются некорректные формулировки о восстановлении уже восстановленного железа: «Профилирование также приводит к повышению интенсивности оксидных компонент и частичному восстановлению металлического Fe».

3. Какое влияние на итоговые значения концентраций, полученных методом Fe L_{2,3} XANES имеет выбор стандартов для подгонки спектров?

4. Соискатель является представителем школы рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии и спектроскопии рентгеновского поглощения в мягкой области рентгена. Однако неясно, почему в настоящей работе не уделено внимание спектроскопии рентгеновского поглощения за K-краем железа, использование которой не требует создания условий сверхвысокого.

5. В работе упоминается отсутствие картин электронной дифракции от синтезированных образцов наночастиц, однако автор не приводит самих экспериментальных данных. Проводились ли эксперименты с рентгеновской дифракцией и каков их результат? Каким образом сделано заключение о формировании неорганической фазы внутри белка, а не молекулярных кристаллов или агрегатов?

6. Раздел 5.2 диссертации называется «Особенности атомного строения структур, сформированных при интеграции массивов нитевидного кремния с молекулами белка бактериоферритина Dps», однако метод рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии чувствителен скорее к электронной конфигурации атомов, а не геометрии их окружения, поэтому термин «атомное строение» выбран неудачно. Если автор имел в виду концентрационные профили распределения элементов в исследуемых образцах, то для их описания следует привести схему композитного материала с наглядным обобщением полученных результатов.

Однако, сделанные замечания носят скорее рекомендательный характер к работе, которая выполнена на высоком научном уровне и оставляет хорошее впечатление после ее изучения.

Заключение по диссертационной работе. Диссертация представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, которая по актуальности поставленных задач, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов, степени

обоснованности выводов и рекомендаций, а также по объёму выполненных исследований и уровню работ, опубликованных в открытой печати, полностью соответствует квалификационным требованиям "Положения о присуждении учёных степеней", утверждённого постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года (со всеми последующими изменениями), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.8 Физика конденсированного состояния.

Таким образом, соискатель Беликов Евгений Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.8. Физика конденсированного состояния.

Согласен на обработку моих персональных данных.

Официальный оппонент:
доктор физико-математических наук (01.04.15 – Физика и технология наноструктур, атомная и молекулярная физика),
заведующий научной лабораторией
Центра наукоемкого приборостроения,
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Южный федеральный университет»

Гуда Александр Александрович

03.12.2025 г.

Адрес места работы:

344090, г. Ростов-на-Дону, ул. Андрея Сладкова, 178/24, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет» Центр наукоемкого приборостроения
тел.: +7(988) 250-88-35, e-mail: guda@sfnu.ru

