

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента на диссертацию**

**АЛЕНЬКИНОЙ Ирины Владимировны**

**“МЕССБАУЭРОВСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ С ВЫСОКИМ СКОРОСТНЫМ  
РАЗРЕШЕНИЕМ НАНОРАЗМЕРНЫХ «ЖЕЛЕЗНЫХ ЯДЕР» В МАКРОМОЛЕКУЛАХ  
ФЕРРИТИНА И ЕГО АНАЛОГОВ”,**

**представленную на соискание ученой степени кандидата физико-  
математических наук по специальности 01.04.07 – Физика конденсированного  
состояния и 03.01.02 – Биофизика**

Диссертационная работа И.В. Аленькиной посвящена исследованию особенностей структуры наноразмерных «железных ядер» в макромолекулах ферритина и его аналогов с использованием мессбауэровской спектроскопии с высоким скоростным разрешением.

**Актуальность работы.** Одним из актуальных и перспективных направлений исследований на стыке физики конденсированного состояния и биофизики является изучение состояния железа в различных органах и тканях человека и животных на атомно-молекулярном уровне. Известно, что ионы железа в живых системах находятся в различных жизненно важных биомолекулах. В частности, в макромолекулах железодепонирующих белков – ферритинов, ионы железа находятся в виде наноразмерных «железных ядер», фактически в наночастицах соединений железа биогенного происхождения. Эти белки обеспечивают живые организмы железом, необходимым для биосинтеза железосодержащих белков. Окружение атомов железа в этих наноразмерных частицах очень неоднородное, вследствие чего на сегодняшний день отсутствуют устоявшиеся модели структуры этих сложных наночастиц с вариабельностью для различных тканей и живых организмов. Это отражается, в частности, на виде мессбауэровских спектров ферритинов. Детальная расшифровка этих спектров требует, во-первых, большого числа каналов спектрометра, во-вторых, высокой стабильности и точности обработки заданного сигнала скорости спектрометром.

Применение метода мессбауэровской спектроскопии с высоким скоростным разрешением позволяет измерять спектры с высоким качеством и большим числом экспериментальных точек в спектре, что дает возможность аппроксимировать их с использованием новых моделей для получения более детальной информации об особенностях структуры наноразмерных «железных ядер» в макромолекулах ферритина и его аналогов. Исходя из вышесказанного, следует, что работа является актуальной.

Кроме этого, проблема поиска подходов к диагностике и лечению злокачественных

заболеваний является одной из важнейших и сложнейших проблем современного мира. Эти задачи решают не только медицинские работники и биологи, но и физики принимают в этом активное участие. Поэтому прогресс в изучении ферритина современными физическими методами и использование новых подходов в исследовании этих белков в норме и при патологии также является весьма актуальным.

**Общая характеристика работы.** Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения, списка цитируемой литературы из 272 наименований. Диссертация изложена на 175 страницах машинописного текста и содержит 26 таблиц и 111 рисунков.

**В первой главе** приведен обзор литературы. В нем описаны структура макромолекулы ферритина, содержащей наноразмерные «железные ядра» в виде оксигидроокиси железа в модификации ферригидрита, окруженного белковой оболочкой, а также структура аналогов ферритина, применяемых для лечения железодефицитной анемии, содержащих наноразмерные «железные ядра» в виде оксигидроокиси железа в модификации акагенита. Рассмотрены многолетние исследования наноразмерных «железных ядер» ферритина и его аналогов различными физическими методами, такими как TEM, XRD, ЭПР, мессбауэровская спектроскопия и другими. И.В. Аленькина проанализировала очень большой объем информации и выявила какие наиболее важные проблемы и задачи требуют решения на данном этапе, четко показала необходимость повышения точности измерений методом мессбауэровской спектроскопии. Исходя из анализа состояния вопроса, ею поставлена цель работы и определены задачи, которым посвящена диссертационная работа. Кроме того, следует особо отметить, что огромное количество переработанной информации и её тщательный анализ, проведенный И.В. Аленькиной, будет полезен для будущих исследователей этой проблемы.

**Во второй главе** приведены методы приготовления образцов исследуемых объектов, а именно: выделенного ферритина печени человека, его фармацевтических аналогов (Имферон, Мальтофер® и Феррум Лек), бактерий *Azospirillum brasilense* (штамм Sp245), содержащих ферритин, тканей печени и селезенки здоровых куриц и больных лимфоидным лейкозом, тканей печени и селезенки здоровых людей и больных злокачественными заболеваниями системы крови. Показано, что образцы для мессбауэровской спектроскопии не превышают пределы тонкого поглотителя для исключения эффектов самопоглощения в образцах. Описаны методы исследования наноразмерных «железных ядер» в изучаемых образцах (рентгеновская дифракция, электронная сканирующая и трансмиссионная микроскопия, гистохимический анализ, термогравиметрия, электронный парамагнитный резонанс, магнитометрия и мессбауэровская спектроскопия). Кроме того, подробно обсуждаются характеристики

мессбауэровского спектрометрического комплекса с высоким скоростным разрешением, созданного на базе прецизионного мессбауэровского спектрометра СМ-2201 (совместная разработка сотрудников УрФУ, Екатеринбург, и Института аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург) и модернизированного криостата с движущимся поглотителем с диапазоном температур 295–85 К (криостат – разработка НИИ физики Южного федерального университета, Ростов-на-Дону). Проведены тщательные калибровочные измерения на стандартных поглотителях и четко показано, что наблюдаемые линии поглощения стандартных поглотителей имеют линии лоренцевой формы. Полученные данные дали И.В. Аленькиной основание в дальнейшем обрабатывать спектры, измеряемые с помощью спектрометра СМ-2201, с использованием линии лоренцевой формы, поскольку все исследованные ею образцы имели толщину, не превышающую предел тонкого поглотителя. Описываются также методы аппроксимации измеренных спектров.

**В третьей главе** рассмотрены результаты исследований макромолекул ферритина и его аналогов методами TEM, SEM, EDS, XRD, ЭПР, термогравиметрии, магнитометрии и результаты мессбауэровской спектроскопии с высоким скоростным разрешением при температурах 295 и 90 К. Аленькина И.В. показала, что в рамках предложенной согласованной модели аппроксимации спектров суперпозицией нескольких квадрупольных дублетов результаты можно интерпретировать как наличие в «железных ядрах» соответствующего числа различных слоев и/или областей, отличающихся степенью кристалличности и плотностью упаковки оксигидроокиси железа. Кроме того И.В. Аленькиной были измерены мессбауэровские спектры выделенного ферритина печени человека и препаратов Мальтофер® и Феррум Лек при 20 и 40 К с низким скоростным разрешением. Обнаружено, что величина барьера энергии магнитной анизотропии для наноразмерных «железных ядер» в ферритине печени человека **ниже, чем в его аналогах** – препаратах Феррум Лек и Мальтофер®, в то время как для самих аналогов величина барьера фактически одинаковая.

**В четвертой главе** описаны результаты измерения мессбауэровских спектров ферритина и препарата Феррум Лек в диапазоне температур 295–90 К. Из температурной зависимости центрального (изомерного) сдвига спектров ферритина и препарата Феррум Лек вследствие квадратичного эффекта Доплера определены температуры Дебая для ферритина печени человека ( $\Theta=461\pm 16$  К) и для препарата Феррум Лек ( $\Theta=502\pm 24$  К). Анализ обнаруженного аномального уширения линий спектров и необычного поведения площадей спектров с понижением температуры позволил автору разработать новую модель, в которой предполагается, что каждая компонента спектра связана с конкретной

областью/слоем/нанодоменом «железного ядра» с однородной структурой, в пределах которой локальное окружение ядер  $^{57}\text{Fe}$  одинаково и, следовательно, значения ширины линий этих компонент одинаковы, но могут свободно варьироваться в процессе аппроксимации. Применение нового подхода к аппроксимации мессбауэровских спектров ферритина и его аналогов позволило провести наилучшую аппроксимацию суперпозицией пяти квадрупольных дублетов и получить температурные зависимости мессбауэровских параметров для отдельных компонент спектров, которые могут быть связаны с различными слоями/областями/нанодоменами «железных ядер». В этом случае И.В. Аленькина объяснила аномальное поведение параметров некоторых компонент спектров низкотемпературными структурными перестройками в соответствующих слоях/областях/нанодоменах наночастиц ферригидрита и акагенита. Новый подход к аппроксимации мессбауэровских спектров ферритина далее был применен для анализа спектров ферритина двух образцов бактерий *A. brasilense* (штамм Sp245), приготовленных в различных условиях, который позволил выявить отличия в гетерогенной структуре «железных ядер» ферритина в этих образцах.

**В главе 5** рассмотрены результаты исследования тканей печени и селезенки, содержащих железоздепонирующие белки, в норме и при злокачественных заболеваниях системы крови методом мессбауэровской спектроскопии. Выявлено, что величина резонансного эффекта в спектрах существенно отличается для нормальных тканей и тканей больных, за исключением ткани селезенки больного лимфомой мантийной зоны. Это означает, что в тканях селезенки больных первичным миелофиброзом и острым миелолейкозом и печени больных лимфомой мантийной зоны и острым миелолейкозом содержание железа существенно выше, чем в нормальных тканях и селезенке больного лимфомой мантийной зоны. Проанализированы причины повышенного содержания железа в тканях и показано, что повышение содержания ферритиноподобного железа в ткани селезенки больного первичным миелофиброзом является следствием увеличения количества макромолекул ферритина в ткани селезенки, а не увеличения количества ионов железа в «железном ядре» с ростом размеров последнего, как в известных из литературы случаях  $\beta$ -талассемии

Были выявлены небольшие отличия параметров сверхтонкой структуры компонент мессбауэровских спектров образцов тканей печени и селезенки здорового человека и трех больных злокачественными заболеваниями системы крови. По величине квадрупольного расщепления эти компоненты были соотнесены с двумя областями наноразмерных «железных ядер», имеющих различную плотность упаковки ферригидрита. Было обнаружено, что для нормы и патологии доли более и менее плотно упакованных

областей в «железных ядрах» ферритина оказались различны, что свидетельствует об изменении процессов формирования структуры «железных ядер». В результате дополнительных магнитных измерений тканей печени в норме и при патологии было показано, что все образцы тканей печени могут содержать очень малую добавку магнетита, выявить которую в мессбауэровских спектрах не представляется возможным.

Следует отметить, что И.В. Аленькина провела очень большую экспериментальную и теоретическую работу, которая позволила получить новые знания в области физики наночастиц и физических процессов в живых организмах.

**Научная новизна** работы состоит в том, что:

Выявлены структурные отличия «железных ядер» выделенного ферритина печени человека, ферритина бактерий *Azospirillum brasilense* (штамм Sp245), фармацевтических препаратов Имферон, Мальтофер® и Феррум Лек.

Показано, что барьер энергии магнитной анизотропии наноразмерных «железных ядер» в макромолекулах ферритина печени человека ниже, чем в его аналогах – препаратах Мальтофер® и Феррум Лек.

Показано, что возможны низкотемпературные структурные перестройки в соответствующих слоях/областях/нанодоменах «железных ядер» ферритина и его аналогов.

Предложена новая модель гетерогенного «железного ядра» для аппроксимации мессбауэровских спектров ферритина печени человека, ферритина бактерий *Azospirillum brasilense* (штамм Sp245), фармацевтических препаратов Мальтофер® и Феррум Лек, позволяющая связать выявленные компоненты спектров с соответствующими слоями/областями/нанодоменами «железных ядер» и оценить их структурные особенности.

Отдельно стоит отметить, что применение комплексного исследования с использованием таких методов, как мессбауэровская спектроскопия, сканирующая электронная микроскопия, рентгеновская дифракция, ЭПР-спектроскопия, магнитометрия и другие методы, дало возможность И.В. Аленькиной получить более полное представление об особенностях структуры наноразмерных «железных ядер» в ферритинах и его аналогах, о низкотемпературных структурных и, возможно, фазовых превращениях, происходящих в этих объектах.

**Научную новизну и значимость** полученных результатов подтверждает их опубликование в рецензируемых отечественных и международных журналах из перечня ВАК, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science, а также их активное обсуждение в рамках международных научных конференций и симпозиумов. Кроме этого,

показателем значимости проведенных исследований является цитируемость работ И.В. Аленькиной (индекс цитирования 16 по базе данных Scopus) различными зарубежными авторами в научных статьях, опубликованных в физических, биофизических и медицинских изданиях, а также в двух книжных главах.

**Достоверность полученных в работе результатов** обеспечивается использованием современного аттестованного оборудования и комплекса различных методов исследования, таких как электронная сканирующая микроскопия, рентгеновская дифракция, магнитометрия и других, включая уникальный мессбауэровский спектрометрический комплекс, созданный на основе спектрометра СМ-2201 с высоким скоростным разрешением и малой инструментальной ошибкой по шкале скоростей, приходящейся на одну точку спектра.

**Личный вклад автора** состоит в участии в формулировании цели и задач исследований, в планировании и проведении экспериментальных исследований, аппроксимации мессбауэровских спектров, в анализе результатов и написании статей, материалы которых вошли в диссертационную работу. И.В. Аленькиной принадлежит решающий вклад в интерпретации и обобщении полученных результатов.

**Замечания.** По тексту диссертационной работы следует сделать ряд замечаний, касающихся оформления текста и предлагаемых моделей.

1. В тексте имеются стилистические неточности, опечатки и присутствуют некоторые погрешности оформления, например на стр.7 формулировка задачи 3 имеет сложное изложение; на стр. 6 Автореферата, 4 строка сверху, два раза повторяется «с высоким скоростным разрешением»; на рисунках имеются обозначения как на русском так и на английском языке (рис.1.11-1.23); сложное изложение вывода № 7 и др.

2. Для обработки мессбауэровских спектров автор использует только программу UNIVEM MS. При непрерывных распределениях магнитных полей, градиентов электрических полей или плотностей электронов на ядрах железа в исследуемых объектах было бы полезным применять и программы, дающие распределения этих величин.

3. На стр. 19 рис. 1.10. идет сравнение спектров рентгеновской дифракции «железных ядер» ферритина лошади, гемосидерина человека и ткани селезенки человека. Следовало бы сравнивать спектры рентгеновской дифракции «железных ядер» ферритина лошади и человека. Это бы позволили более достоверно анализировать и интерпретировать результаты других измерений.

4. В параграфе 4.2 из температурных зависимостей изомерных сдвигов определены температуры Дебая для ферритина и препарата Феррум Лек. Значения температур Дебая в пределах погрешности измерений совпадают, однако значительно отличаются от данных,

полученных другими исследователями из температурной зависимости площадей спектров. Имея все данные, автор мог бы определить температуры Дебая из температурных зависимостей площадей спектров. Тогда возможно было бы более точно интерпретировать отличия в значениях температур Дебая.

5. Для препарата Мальтофер нет температурной зависимости параметров в диапазоне 295-90 К, а только две крайние точки при 295 и 90 К; будут ли эти зависимости иметь тот же характер, что и для ферритина и препарата Феррум Лек?

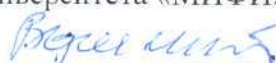
Несмотря на указанные замечания, диссертационная работа И.В. Аленькиной заслуживает общей высокой оценки.

В целом, диссертация И.В. Аленькиной представляет собой законченное исследование, посвященное решению актуальных проблем физики конденсированного состояния и биофизики. Работа имеет высокую научную и практическую значимость. Полученные результаты позволяют лучше понять особенности физики наночастиц оксигидроокиси железа, а также процессы формирования структуры «железного ядра» в белке ферритине и его аналогах.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, а ее автор, АЛЕНЬКИНА Ирина Владимировна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.07 – Физика конденсированного состояния и 03.01.02 – Биофизика за получение данных о состоянии наноразмерных «железных ядер» в макромолекулах ферритина и его фармацевтически важных аналогах, а также в железодепонирующих белках тканей печени и селезенки в норме и при злокачественных заболеваниях.

Доктор физико-математических наук, профессор,  
профессор кафедры прикладной ядерной физики  
Национального исследовательского  
ядерного университета «МИФИ»



Филиппов Валентин Петрович

01 ноября 2016 г.

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

115409, г. Москва, Каширское шоссе, 31

[vpfilippov@mephi.ru](mailto:vpfilippov@mephi.ru) 8-495-788-56-99 доп. 90-64

Подпись удостоверяю  
Заместитель начальника отдела  
документационного обеспечения  
НИЯУ МИФИ

