

УТВЕРЖДАЮ

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ФГБУН Института физической химии
и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН



_____ академик А. Ю. Цивадзе

« 08 » октября 2014 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Потолицыной Веры Евгеньевны

«Расширение аналитических возможностей капиллярного электрофореза и капиллярной электрохроматографии для определения микроконцентраций белков в биологических жидкостях»,

представленную к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

Актуальность

Анализ белков является основной частью любых биохимических исследований. Количественное определение целевых белков и белковых комплексов в биологических жидкостях электрофоретическими методами является одной из важнейших областей исследования в современной биоаналитической химии. Однако необратимая адсорбция белков на стенках кварцевого капилляра в процессе электрофоретического разделения пептидов и белков может исказить результаты анализа и приводить к невозможности параметров их миграции. В связи с этим перспективным является поиск и использование новых полимерных материалов в качестве стационарных и псевдостационарных фаз, позволяющих контролировать селективность разделения, модифицировать стенки кварцевого капилляра, способствовать повышению эффективности и снижению пределов обнаружения аналитов за счет различных вариантов on-line концентрирования.

Диссертационная работа Потолицыной В.Е. посвящена решению этой **актуальной**

задачи: выявлению возможностей использования водорастворимых сверхразветвленных полиэтилениминов с мальтозной оболочкой в качестве стационарных и псевдостационарных фаз и поиску новых вариантов *on-line* концентрирования при электрофоретическом определении белков в биологических жидкостях. Подобные исследования на начало выполнения данной диссертационной работы были весьма немногочисленны, особенно, в области такого активно развивающегося метода разделения как капиллярная электрохроматография (КЭХ).

Личное участие автора в планировании и проведении эксперимента, получении результатов и их интерпретации, выявлении закономерностей и формулировки основных выводов, что подтверждается списком опубликованных работ (5 статей в рецензируемых журналах и 24 тезиса докладов).

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

В диссертационной работе выявлено влияние водорастворимых олигосахаридных производных сверхразветвленного полиэтиленимина с различной массой ядра (5 и 25 кДа) и степенью функционализации мальтозой в качестве стационарных и псевдостационарных фаз на параметры миграции белков при их электрофоретическом определении. Диссертантом установлен факт динамической модификации стенок кварцевого капилляра при введении сверхразветвленных полиэтилениминов с мальтозной оболочкой в состав рабочего буфера, что позволяет увеличить воспроизводимость параметров миграции и обеспечить эффективность до 4×10^5 т.т./м при групповом анализе белков методом капиллярной электрокинетической хроматографии.

Предложены различные варианты *on-line* концентрирования альбумина, лизоцима, инсулина и миоглобина на синтезированных PLOT-колонок, модифицированных олигосахаридными производными сверхразветвленного полиэтиленимина и установлено, что сочетание электростэкинга и стэкинга с большим объемом вводимого образца обеспечивает концентрирование белков с факторами концентрирования 900 – 1320.

Впервые показано, что в качестве оценочного контроля сорбции белков на внутренней поверхности PLOT-колонок, модифицированных дендритным полимером, может быть использован метод эллипсометрии.

Практическая значимость

Предложена технология изготовления PLOT-колонок для капиллярной электрохроматографии с использованием метакрилатных и дендритных полимеров на основе полиэтиленимина с мальтозной оболочкой в качестве стационарных фаз, обеспечивших

высокую селективность разделения и воспроизводимость параметров миграции белков.

Предложен вариант электрофоретического определения альбумина в сыворотке крови и моче на уровне диагностически значимых концентраций.

Структура и содержание работы.

Диссертационная работа оформлена в соответствии с правилами и рекомендациями ВАК Минобрнауки РФ и состоит из введения, обзора литературы, характеристик исследуемых объектов и методов, обсуждения полученных результатов, заключения, списка цитируемой литературы, используемых сокращений и приложения. Материалы диссертации изложены на 156 страницах и содержат 15 таблиц и 79 рисунков.

В литературном обзоре обсуждаются физико-химические методы определения белков; варианты *on-line* концентрирования; основы метода капиллярной электрохроматографии (КЭХ) и особенности применения *PLOT*-колонок в КЭХ; строение сверхразветвленных полимеров, области их применения в методах разделения; специальный раздел посвящен использованию метода эллипсометрии для контроля сорбции белков.

Тщательный анализ литературных данных способствовал грамотному выбору стратегии при постановке собственных экспериментов.

Диссертационная работа следует классической методологии: выбор условий анализа электрофоретического определения белков на модельных смесях с использованием полиметакрилатных и дендритных полимеров в качестве стационарных и псевдостационарных фаз; синтез *PLOT*-колонок с требуемым покрытием; независимое подтверждение наблюдаемых закономерностей (отсутствие сорбции белков на стенках кварцевого капилляра, модифицированных полимером на основе полиэтиленimina) методом эллипсометрии; реализация обнаруженных закономерностей при анализе биологических жидкостей. Решение целевой задачи потребовало от диссертанта проведения значительного по объему предварительного исследования по выявлению влияния дендритных полимеров с различной массой ядра и степенью функционализации мальтозой на параметры миграции белков в условиях электрокинетической капиллярной хроматографии (ЭКХ) и капиллярной электрохроматографии (КЭХ).

В целом, теоретическая и практическая значимость диссертационной работы Потолицыной В.Е. не вызывают сомнений. Сложность в решении поставленных задач потребовала использования адекватного научного аппарата, соответствующих практических навыков в оптимизации условий электрофоретического анализа, применения специального оборудования.

Все изложенное дает возможность оценить **достоверность** полученных данных и

сделанных на их основе выводов, которые не вызывают сомнений. Можно отметить, что полученные автором результаты расширяют существующие представления в области капиллярной электрохроматографии при электрофоретическом определении белков. Диссертация изложена хорошим литературным языком, хорошо оформлена.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Результаты работы и теоретические положения могут быть включены в курсы лекций по аналитической химии и органическому анализу на химических факультетах Московского государственного университета, Новосибирского гос. университета, в Санкт-Петербургском государственном технологическом институте, Иркутском государственном университете.

Замечания к работе

1. В диссертации получен интересный и важный результат: при введении в состав рабочего буфера полимера С (наименьшая функционализации мальтозными фрагментами) происходит обращение электроосмотического потока и достигается эффективность до 4×10^5 т.т./м. Однако селективность разделения снижается. Какую цель преследует, в первую очередь, автор работы?
2. На стр. 103 утверждается, что «...полимеры PEI-Mal, введенные в состав рабочего электролита при низких концентрациях (0,5 мг/мл), могут быть использованы в качестве динамического покрытия для подавления необратимой адсорбции белка при $pH < 7$ ». Как долго сохраняется в рабочем состоянии подобное динамическое покрытие?
3. Не совсем понятен выбор значений pH в условиях капиллярной электрокинетической хроматографии при изучении влияния дендритных полимеров на параметры миграции белков?
4. Не ясно почему автор не сравнивает результаты адсорбции белков, полученные электрофоретическими методами и методом эллипсометрии.

Заключение

Сделанные замечания не принципиальны и не сказываются на общей высокой оценке диссертационной работы Потолицыной В.Е. Сформулированные в работе выводы строго аргументированы и новы и носят обобщающий характер. Следует отметить высокую достоверность и апробацию результатов данной работы. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, а также 24 тезиса докладов Всероссийских и Международных конференций. Представленный материал диссертации достаточно полно отражен в автореферате.

Диссертация Потолицыной В.Е. на тему «Расширение аналитических возможностей капиллярного электрофореза и капиллярной электрохроматографии для определения микроконцентраций белков в биологических жидкостях», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия, является цельной и завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на актуальную тему, связанную с приоритетными направлениями и программами развития отечественной фундаментальной и прикладной науки с использованием современных концепций и экспериментальных методологий. Она существенно расширяет аналитические возможности электрофоретических методов для анализа биологических объектов.

По **актуальности** решаемой задачи, **научной новизне**, объему выполненных исследований и **практической значимости** полученных результатов диссертационная работа Потолицыной В.Е. соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор достоин присуждения искомой степени по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Отзыв на диссертацию В.Е. Потолицыной и автореферат обсужден на заседании института физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН «_09_» __октября_ 2014 г., протокол №_8-10/2014-1.

Председатель Секции
член-корр. РАН
Секретарь Секции
Отзыв составлен:

зав. лабораторией физико-химических основ хроматографии
и хромато-масс-спектрометрии, д.х.н. А.К. Буряком

 Л.Б. Бойнович
 Д.А. Попов

