

О Т З Ы В официального оппонента

о диссертационной работе Гладилевича Владимира Дмитриевича “Разработка новых металл-аффинных сорбентов, содержащих железо(III), для решения задач фосфопротеомики”, представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук (специальности 02.00.11 – коллоидная химия, 02.00.02 – аналитическая химия).

Диссертация Владимира Дмитриевича Гладилевича посвящена разработке и синтезу новых металл-аффинных сорбентов, содержащих железо (III), и изучению их физико-химических и поверхностных свойств.

Одной из важнейших задач современных исследований в области нанотехнологий является разработка и получение поверхностных плёнок с заданными свойствами: определенной структурой и составом, способностью избирательно взаимодействовать с компонентами окружающей среды и т.д. Одним из перспективных способов получения таких пленок является метод Ленгмюра-Блоджетт. Уникальность этого метода состоит в возможности на молекулярном уровне влиять на состав, структуру, толщину и свойства пленок, изменяя состав монослоя и условия его переноса на твердую подложку. В последние годы активно изучаются плёнки Ленгмюра-Блоджетт (ПЛБ) на основе стеаратов трех- и двухвалентных переходных металлов (Fe(III), Cr(III), Ni(II), Cu(II)), способных образовывать комплексы с различными органическими лигандами, что необходимо при создании металл-аффинных сорбентов. Металл-аффинные сорбенты используются при разделении и очистки белков методом аффинной хроматографии. Разработка, получение и изучение физико-химических, сорбционных свойств металл-аффинных сорбентов важно не только с научной точки зрения, но имеет и большое практическое значение. Знание закономерностей взаимодействия биологических лигандов с активными центрами таких

сорбентов позволяет оптимизировать процессы разделения и очистки белковых систем и необходимо при создании различных лекарственных средств (различных вакцин, экспресс тестов для анализ крови, препаратов, использующихся для улучшения кровообращения сосудов, что особенно важно в постинсультный период), при диализе крови и многое другое.

Существенным недостатком разработанных к настоящему времени сорбентов на основе Fe (III) является достаточно высокий уровень неспецифичной сорбции и, как следствие, низкая селективность, невозможность использования в аппаратном оформлении при потоковых анализах. Практически не изучена возможность использования металл-аффинных сорбентов для выделения фосфонилированных белков и пептидов. Специфичное выделение таких белков необходимо при токсикологическом анализе, идентификации отравляющего вещества.

Создание новых сорбентов, содержащих железо(III), исследование возможности их использования в фосфопротеомном анализе способствует получению важной информации о металл-аффинных сорбентах и расширению области их применения.

В связи с отмеченным, тема диссертационной работы В.Д. Гладиловича, посвященная указанным проблемам, важна как для дальнейшего развития теоретических представлений в области физической химии поверхностей, так и для успешного их практического применения, и является, несомненно, **актуальной**.

Целью диссертационной работы является разработка и характеристика новых металл-аффинных сорбентов, содержащих железо(III), для применения в фосфопротеомном анализе.

Диссертация содержит Введение, четыре главы, Список сокращений, Список литературы, включающий 114 наименований и Приложение. Полный объем диссертации 116 страниц.

Во **Введении** охарактеризовано общее направление исследования, показана научная новизна работы и её практическая значимость, сформулированы основные научные положения, выносимые на защиту. Представлена информация об апробации работы и публикациях по материалам диссертации. Эта часть работы изложена достаточно ясно, вопросов и возражений не вызывает.

Первая глава диссертации представляет собой литературный обзор, охватывающий вопросы получения, строения и свойств ПЛБ. Рассмотрены особенности получения пленок методом Ленгмюра-Блоджетт и механизмы формирования ПЛБ, выбор состава водной субфазы при получении ПЛБ, изотермы сжатия пленок. Представлены общие сведения и принцип действия метода металл-аффинной хроматографии, проведен анализ используемых сорбентов. Рассмотрены особенности применения метода металл-аффинной хроматографии в протеомных и фосфопротеомных исследованиях. Приведены ссылки на 97 источников. На основании литературного обзора диссертантом сформулированы цели и задачи диссертационной работы. Приведенный литературный обзор достаточно подробно характеризует современное состояние избранной диссертантом области химического знания и свидетельствует о высокой научной эрудиции автора.

В **Главе 2**, «Материалы и методы», экспериментальной части диссертации, рассмотрены используемые в работе методы получения сорбентов и исследования их физико-химических свойств. При изложении методик синтеза металл-хелатного сорбента (МХС) и металл-оксидного сорбента (МОС) в пунктах 2.2.1. и 2.2.8 подробно и поэтапно расписаны условия синтеза (количественный состав реакционной смеси, специальные добавки, температурные, кинетические режимы синтеза), что в дальнейшем, несомненно, будет способствовать использованию разработанных методик

синтеза МХС и МОС на практике. Исследование структурных характеристик и поверхностных свойств, синтезированных сорбентов выполнено различными методами с применением современного высокоточного оборудования (п.п. 2.2.2-2.2.7., 2.2.9 и 2.2.10). В п.п. 2.3. – 2.5. подробно описаны методы исследования и расчета электрокинетических и сорбционных характеристик сорбентов. В п.п. 2.6. и 2.7. описаны методы металл-аффинной хроматографии, масс-спектрометрический и жидкостной хроматографии. Подробно описаны способы обработки экспериментальных данных для всех использованных в исследовании физико-химических методов. Изложение материалов второй главы диссертации выполнено обстоятельно и на высоком научном уровне.

Глава 3 диссертации посвящена рассмотрению экспериментальных результатов и их обсуждению. Учитывая требования, выдвигаемые к характеристикам металл-аффинных сорбентов, диссертант предложил две структуры сорбентов, отвечающих этим требованиям и разработал два вида сорбентов МХС и МОС. Автором впервые разработаны оригинальные методики синтеза сорбентов МХС с использованием коллапсированных монослоев пленок Ленгмюра-Блоджетт и МОС с использованием золь-гель метода с совместным самораспространяющимся синтезом, индуцированным микроволновым излучением. Проанализировано влияние условий синтеза на структурные и поверхностные характеристики сорбентов, разработаны условия выделения фосфорилированных пептидов. Проведенные исследования позволили диссертанту синтезировать сорбенты, обладающие высокой селективностью, позволяющей в дальнейшем их использование при анализе белковых систем. Материалы данной главы оригинальны и изложены на достаточно высоком научном уровне.

В Главе 4 («Основные результаты») сформулированы выводы, отражающие в полной мере объем, новизну и возможности практического использования результатов диссертационной работы. Материалы этого

раздела диссертации информативны, изложены на достаточно высоком научном уровне и критических замечаний не вызывают.

Далее приводятся список сокращений, список литературы и Приложение, что значительно облегчает работу с диссертацией.

Наиболее важные результаты, полученные лично соискателем, и их научная новизна.

Соискателем

- впервые показана возможность использования коллапсированных монослоев- пленок Ленгмюра-Блоджетт на основе стеарата железа(III) – МХС Fe(III) – в качестве сорбентов для металл-аффинной хроматографии.

- впервые золь-гель методом с совместным самораспространяющимся синтезом, индуцированным микроволновым излучением, получены наноразмерные структуры на основе оксида железа(III) – МОС Fe(III). Установлено, что размер полученных частиц составляет 50-100 нм. Показана возможность их использования в качестве металл-аффинных сорбентов.

- показано, что разработанные сорбенты обладают высокой селективностью и могут быть применены для анализа биологических образцов.

В работе использовались современные методы физико-химических исследований: динамического светорассеяния, адсорбционной порометрии, микроскопии, спектроскопии, для исследования размера наночастиц и их электрокинетического потенциала, жидкостной хроматографии, масс спектрометрии.

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов работы обеспечиваются использованием современных методик исследований, высокими точностью и воспроизводимостью проводимых измерений, значительным объемом экспериментальных данных,

подтверждающих сформулированные в работе выводы.

Результаты исследований свойств синтезированных МХС и МОС, полученные различными методами, хорошо согласуются между собой.

Практическая значимость работы подтверждается следующим:

1. В последнее время установлено, что металл-аффинные сорбенты, в частности, на основе железа (III) можно успешно использовать при разделении и очистки белков. Разделение и очистка белков широко используется в аналитических целях (анализ крови), для приготовления экспресс тестов на антитела.

2. Металл-аффинные сорбенты можно использовать для очистки крови от токсинов и при болезнях почек.

3. Высокая сорбционная селективность МХС и МОС найдет применение при создании лекарственных препаратов на основе белков. Белки, которые используются для приготовления лекарственных средств, выделяют и очищают из крови (или других компонентов) животных. Лекарственные препараты на основе белков активно используются для улучшения мозгового кровообращения в пред- и пост-инсультный периоды, при ряде раковых заболеваний, в диагностических целях.

Критические замечания по диссертационной работе:

1. В таблице 1 стр.46 представлены результаты определения доли перехода стеариновой кислоты в соль. В области рН от 3,5 до 4,5 доля перехода выше 1, что не согласуется с обычным понятием доли.

2. В п.п. 3.1.2. показано, что в монослое при взаимодействии стеариновой кислоты с железом (III) в растворе не образуется $FeSt_3$, а присутствует катион дистеарата железа (III) - $FeSt_2^+$. Автор, не рассматривает гидролиз катионов железа в водных растворах. Согласно данным Байеса и Месмера (Baes C.P., Mesmer R.E. // Hydrolysis of cations. N.-Y. 1976. P.489.) в

водных растворах солей железа (III) в области $\text{pH} > 2$ нет катионов Fe^{3+} , а есть только его различные гидролизованные формы. Что согласуется с уменьшением доли перехода стеариновой кислоты в области $\text{pH} \sim 4,5$. В диапазоне pH от 4,0 до 5,5 в растворе вначале резко увеличивается содержание катиона FeOH^{2+} , а затем уменьшается вследствие образования $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ и более сложных гидролизных форм железа. В этом случае механизм специфического взаимодействия лигандов биологически активных веществ с активными центрами поверхности сорбента можно рассматривать как лигандный обмен между OH^- и активными группами полипептида.

3. В п.п. 3.1.5. анализируются процессы сорбции и десорбции фосфорилированного белка на ПЛБ на основе стеарата железа методом атомно-силовой микроскопии. Хотелось бы получить количественной оценку процессов десорбции.

4. В п.п.3.2.4. рассматриваются условия протекания процесса сорбции фосфорилированного белка (в кислой среде) и десорбции с помощью раствора аммиака (при более высоких значениях pH) и не рассматривается возможный механизм процесса. Согласно рис.19, в кислой области поверхность оксида железа заряжена положительно. Свидетельствует ли это о возможности сорбции белка за счет взаимодействия карбоксильных групп белка с положительно заряженными активными центрами на поверхности оксида? – данный вопрос оставлен без внимания.

Указанные замечания и вопросы дискуссионного характера не влияют на общее положительное впечатление о диссертационной работе В.Д. Гладиловича, которая представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу, выполненную по специальностям 02.00.11. – коллоидная химия; 02.00.02 – аналитическая химия. Сформулированные автором диссертации выводы обоснованы и достоверны. Работа изложена

хорошим научным стилем. Основное содержание диссертации и выносимые на защиту положения опубликованы в 4 статьях в журналах, рекомендованных ВАК, и 6 тезисах докладов на международных и всероссийских конференциях.

Актуальность темы, достоверность и новизна основных выводов диссертационной работы, а также их ценность для науки и практики убедительно обоснованы.

В целом, диссертацию В.Д. Гладиловича можно квалифицировать как решение сложной задачи, имеющей важное научное и практическое значение, - разработки новых металл-аффинных сорбентов, содержащих железо (III), для решения задач фосфопротеомики.

Автореферат правильно отражает основное содержание диссертации и авторских научных публикаций. Диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением №842 Правительства РФ от 24 сентября 2013 года. Автор диссертации Владимир Дмитриевич Гладилович заслуживает присуждения ему учёной степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.11 – коллоидная химия, 02.00.02 – аналитическая химия.

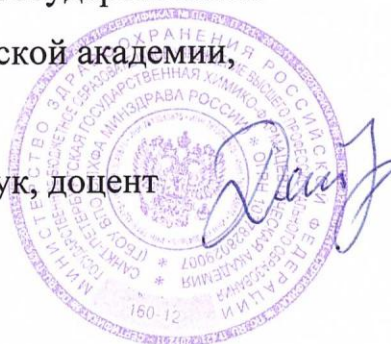
Официальный оппонент

доцент кафедры физической и коллоидной химии

Санкт-Петербургской государственной

химико-фармацевтической академии,

доктор химических наук, доцент



И.Б. Дмитриева

03.04.2014 г.

Подпись руки *Дмитриевой И.Б.*
удостоверяю *03.04.2014*
Начальник ОД *Лавинин Ч.С.*