

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета Степаненко Олеси Викторовны на диссертацию Сыча Томаша Сергеевича на тему «Люминесцентные кластеры благородных металлов, стабилизированные белковыми матрицами: фотофизические и структурные свойства, практические применения», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.8. Физика конденсированного состояния.

Представленная к защите диссертационная работа посвящена анализу люминесцентных кластеров серебра и золота, стабилизированных белковыми матрицами. Актуальность и своевременность изучения таких объектов обусловлена возможностью их использования в аналитических и сенсорных приложениях. Способность к люминесценции позволяет использовать кластеры металлов в качестве зондов в биологических средах, в том числе, и для визуализации внутриклеточных объектов *in cellulo*. Кластеры металлов обладают целым рядом преимуществ относительно широко распространенных красителей, включая низкую токсичность, высокую биосовместимость, достаточно высокую яркость люминесценции и стабильность во времени. Важно отметить комплексный подход диссертанта к проведению исследований: в рамках работы были рассмотрены вопросы синтеза кластеров металлов, уделено внимание оптимизации синтеза изучаемых объектов, всесторонне охарактеризованы их спектральные и фотофизические свойства, предложена структура кластеров металлов, рассмотрен вопрос их практического применения.

Диссертационная работа имеет традиционную структуру и состоит из введения, литературного обзора, описания методологии и синтеза кластеров, экспериментальной части, заключения, благодарностей и списка литературы, включающего 234 ссылки. Объем диссертации составляет 237 страниц текста, включающих в себя 17 таблиц и 139 рисунков. Диссертантом вынесено на защиту 7 положений.

В Главе 1 автором представлен обширный литературный обзор по тематике диссертации, в котором рассмотрены люминесцентные кластеры серебра и золота, стабилизированные различными биологическими полимерами, включая белки. Обзор содержит подробный анализ примеры практического применения кластеров металлов, как правило, в сенсорных приложениях. Рассмотрены примеры функционирования кластеров металлов в реальных биологических средах (клетки и живые организмы).

В Главе 2 дано описание использованной автором методологии синтеза кластеров, уделено внимание химическим свойствам металлов и реакциям, протекающим с их участием, проанализированы физико-химические свойства используемых в работе стабилизирующих матриц. Подробно рассмотрены экспериментальные и теоретические методы исследования.

В Главах 3 и 4 приведены результаты анализа фотофизических свойств серебряных и золотых кластеров, стабилизированных белковыми и аминокислотными матрицами. Автор диссертации подробно рассматривает аспекты, связанные с синтезом кластеров металлов и оптимизацией этой процедуры. Среди рассмотренных стабилизирующих матриц фигурирует целый ряд белков и аминокислот, важных для функционирования

организма. Анализируемые объекты подробно охарактеризованы с применением широкого спектра экспериментальных методов. Отдельно следует выделить применение комплексного теоретико-практического подхода, благодаря которому удалось предложить структуры некоторых серебряных кластеров.

В Главе 5 рассмотрена возможность практического применения полученных ранее кластеров для решения задачи определения концентрации белков в сыворотке крови человека. Описан способ применения серебряных кластеров, позволяющий проводить идентификацию «больной/здоровый» для конкретного онкогематологического заболевания. Предложен оригинальный подход определения концентрации белков в сыворотке с использованием золотых кластеров, сочетающий колориметрический и люминесцентный анализ.

Диссертационная работа Сыча Томаша Сергеевича написана грамотно и логично, результаты изложены четко и понятно, данные проиллюстрированы в полной мере. Выводы диссертанта логически обоснованы, сформулированные положения, вынесенные на защиту, обоснованы. Основные результаты опубликованы в пяти работах в профильных журналах с высоким импакт-фактором, большинство из которых первого и второго квартала.

Вместе с тем, после прочтения работы возник ряд вопросов и замечаний:

1) В обзоре литературы приведено множество примеров разработанных к настоящему времени кластеров металлов. Структурирование собранной информации в виде таблицы, суммирующей основные свойства кластеров, преимущества и ограничения носителей разной природы существенно облегчило бы чтение обзора. Не хватает обобщения о том, на что влияют вид и состав матриц, условия формирования кластеров, т.е. о первичных факторах, определяющих спектральные и фотофизические свойства получаемых кластеров. Говоря о биологических применениях кластеров, необходимо рассмотреть вопросы их доставки в клетки.

2) В разделе 2.4 указывается «Свойства матрицы после размораживания не изменялись». Какие свойства имеются в виду и какими методами оценивали их сохранность? Как контролировали значение pH получаемых растворов?

3) На странице 117 обсуждается эффект «внутреннего фильтра». Полагаю, что в виду спектральных свойств изучаемых объектов (большого стоксового сдвига кластеров металлов) рассматривается эффект «первичного внутреннего фильтра». Данный эффект не связан с «перепоглощением».

4) Обсуждение на стр. 126 о «нативности» БСА в сильнощелочных условиях некорректно. В этих условиях БСА, согласно ссылке 206 приведенной в работе (см. также Ahmad et al., 2004, Protein Pept Lett., 11(4):307, doi 10.1007/s00249-008-0335-7), не функционален, а значит, не может считаться нативным. Полученные в этой части результаты было бы логичнее обсуждать в свете остаточной структуры, присутствующей в денатурированном состоянии белка. Кроме этого, данные, полученные в случае синтеза металлических кластеров на матрице БСА в присутствии серосодержащего восстанавливающего дисульфидные связи агента β-меркаптоэтанола (стр. 126),

необходимо сопоставить с данными, полученными при использовании восстанавливающего агента другой природы – трис(2-карбокситил)фосфина (стр. 135).

5) При возбуждении на длине волны 280 нм вклад в суммарную флуоресценцию белка дают не только остатки триптофана (стр. 133–134).

6) Встречаются некорректно сформулированные фразы, неверно использованные термины, аббревиатуры химических веществ без расшифровки, например «поддомен» (стр. 105), «провести оптимизацию протокола синтеза под новую меньшую концентрацию белка» (стр. 130), «ТКЭФ» (стр. 135).

7) При представлении измеряемых параметров в относительных единицах следует указывать рефересную величину, на которую проводили нормировку.

8) В работе показано различие аминокислотных сайтов связывания кластеров серебра и структуры самих кластеров на ряде белковых матриц (альбуминов, ДНК-связывающих белков, лизоцима). Какова предположительная организация кластеров серебра, стабилизированных иммуноглобулинами, также исследуемыми в данной работе?

Несмотря на то, что ряд вопросов затрагивает весьма важные и содержательные части работы, это никоим образом не снижает общей положительной оценки диссертации. Диссертантом решена задача, имеющая важное фундаментальное значение для рассматриваемой области исследований, а именно: синтез новых биосовместимых люминесцентных объектов и их структурно-функциональная характеристика. Практическая ценность диссертационной работы отражена демонстрацией принципиальной возможности практического применения синтезированных кластеров металлов в клинических и диагностических целях.

Диссертация Сыча Томаша Сергеевича на тему: «Люминесцентные кластеры благородных металлов, стабилизированные белковыми матрицами: фотофизические и структурные свойства, практические применения» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Сыч Томаш Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.8. Физика конденсированного состояния. Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не обнаружены.

Член диссертационного совета

Доктор биол. наук,
в.н.с. Лаборатории структурной динамики,
стабильности и фолдинга белков,
ФГБУН Институт цитологии РАН

25.04.2023

Степаненко О.В.



Степаненко О. В.
25.04.2023
Балагуша