

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук Долгих Олега Владимировича на диссертационную работу Храмцова Павла Викторовича на тему «Применение наночастиц с белковым покрытием в качестве диагностических реагентов для иммуноанализа», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология

Актуальность темы диссертации. Иммуноанализы используются в сфере клинической лабораторной диагностики и фундаментальной биомедицины для количественного и качественного определения биомолекул, низкомолекулярных веществ искусственного происхождения, ионов тяжелых металлов. Наиболее популярной разновидностью иммуноанализов является планшетный иммуноферментный анализ, основанный на измерении сигнала, который генерируют ферменты, превращающие бесцветный субстрат в окрашенный или люминесцирующий продукт. Помимо ферментов метками служат флуоресцентные органические красители или микросферы, цветные частицы, а также магнитные материалы. Некоторые из перечисленных меток, входящих в состав коммерческих тест-систем, представляют собой наноматериалы, например, золотые наночастицы, широко применяемые в иммунохроматографических тестах. Наночастицы обладают некоторыми отличительными свойствами, которые могут позволить улучшить различные аспекты иммуноанализов, например, добиться более низкого предела детекции, сократить длительность анализа, уменьшить требуемый объем образца, упростить процедуру анализа и т.д. Помимо этого, некоторые физико-химические свойства наноматериалов дают возможность создавать принципиально новые форматы иммуноанализов, которые имеют существенные преимущества в сравнении с традиционными подходами. Диссертационное исследование направлено на разработку и применение в иммуноанализе диагностических реагентов на основе магнитных железоуглеродных наночастиц, а также наночастиц, обладающих каталитической пероксидазоподобной активностью.

Все вышеизложенное подтверждает актуальность данного диссертационного исследования.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации. Целью диссертационного исследования была разработка и обоснование концептуальных подходов к получению диагностических реагентов для иммуноанализа на основе наночастиц с различным белковым покрытием. Для достижения поставленной цели автором были поставлены 4 задачи. По итогам исследования сформулировано 4 положения, выносимых на защиту, и 4 вывода. Сделанные автором выводы полностью соответствуют поставленным цели, задачам и полученным результатам. Обоснованность полученных результатов и выводов подтверждается грамотным дизайном исследования, корректным выбором и применением методов статистической обработки результатов, а также достаточным объемом проанализированных данных.

По материалам диссертации опубликовано 19 научных работ, из них 15 статей в изданиях, включенных в Перечень ВАК для публикации результатов диссертационных

исследований по специальности 3.2.7. Иммунология и/или индексируемых в МБД Scopus, WoS и RSCI, 4 патента РФ.

Таким образом, научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертации П.В. Храмова, являются научно обоснованными.

Достоверность и новизна исследований, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации. Достоверность результатов, полученных в диссертации, подтверждается анализом большого объема экспериментальных данных. Практическая применимость разработанных диагностических реагентов продемонстрирована при помощи модельных иммуноанализов в различных форматах (сэндвич-анализ, прямой и непрямой анализы) и дополнительно подтверждена при помощи требуемых контрольных образцов. Все результаты представлены в виде графиков и таблиц, отражающих средние значения и разброс каждого из признаков. Для обработки данных автором использованы корректные статистические методы.

В диссертации продемонстрирован принципиально новый способ (защищен патентом РФ) синтеза диагностикумов для иммуноанализов, в которых для регистрации результата использован метод ядерно-магнитного резонанса. Особенностью метода является применение различных белковых молекул для покрытия магнитных наночастиц. Такой подход обеспечивает хорошую стабильность диагностикумов, что всегда важно, когда речь идет о наноразмерных частицах, которые подвержены агрегации. Автором диссертационного исследования предложены новые, весьма перспективные диагностические реагенты, представляющие собой наночастицы, имитирующие активность пероксидазы хрена. Как и в случае с магнитными метками, их стабильность обеспечивается за счет наличия белковой оболочки. Также в диссертации были представлены новые способы синтеза диагностикумов, представляющих собой антительные конъюгаты наноразмерных комплексов различных белковых молекул и наноматериалов, обладающих пероксидазной активностью. *Новизна исследований* подтверждена наличием у автора диссертации двух патентов РФ на изобретения: первый описывает новый метод синтеза желатиновых наночастиц, а второй – способ иммуноанализа при помощи метода ядерно-магнитного резонанса.

Значимость полученных результатов для теории и практики. Значимость исследования состоит в том, что автором предложен универсальный подход к получению диагностикумов для иммуноанализов с самыми разными режимами регистрации сигнала. Сущность этого подхода состоит в использовании белковых молекул для покрытия или инкапсулирования меток. Сами метки при этом могут иметь различную природу: это могут быть и наночастицы разного состава, и малые молекулы со способностью к флуоресценции или катализу. В диссертации продемонстрирована возможность управлять свойствами диагностикумов путем использования разных белков в качестве модификатора поверхности наночастиц. Автором подробно исследованы взаимоотношения между типом белкового покрытия и физико-химическими свойствами наноматериалов, что позволяет предсказывать поведение таких материалов и подбирать нужный тип покрытия для решения конкретной диагностической задачи.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета для магистров 2 года обучения. Разработанная тест-система определения иммуноглобулинов класса G применяется в повседневной практике лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии «ИЭГМ УрО РАН».

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Диагностические реагенты, разработанные в ходе проведения диссертационного исследования, могут быть использованы для создания тест-систем, предназначенных для количественного обнаружения широкого спектра мишеней. Полученные данные по влиянию состава субстратных буферов на пероксидазную активность наноматериалов имеют перспективы применения при разработке коммерческих субстратов на основе пероксидазы хрена и ее аналогов. Синтезированные желатиновые наночастицы могут быть использованы не только для создания диагностических систем в иммуноанализе, но и для разработки искусственных матриц при выращивании клеток в трехмерных культурах.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом. Диссертационная работа изложена на 303 страницах машинописного текста, иллюстрирована 70 рисунками и 11 таблицами. Структура работы включает введение, обзор литературы, главу с описанием материалов и методов исследования, 5 глав с изложением результатов собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературных источников, в том числе 2 работы в отечественных и 405 - в зарубежных изданиях.

Во введении автор обосновал актуальность, новизну и значимость исследования, определил его цель и задачи, а также представил ключевые результаты и выносимые на защиту положения.

В обзоре литературы были рассмотрены основные группы наноматериалов, которые используются в колориметрических иммуноанализах и иммуноанализах, основанных на ядерно-магнитном резонансе. Также были описаны проблемы синтеза и применения наноматериалов с белковым покрытием в иммунодиагностике.

Во второй главе представлены методы исследования, которые автор использовал для синтеза белковых наночастиц и наночастиц, покрытых белками. Для оценки структуры и свойств наночастиц использовались различные методы, включая сканирующую электронную микроскопию, атомно-силовую микроскопию, просвечивающую электронную микроскопию, энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию, динамическое светорассеяние, рентгенофазовый анализ и другие.

В третьей главе автор описал способ получения диагностикумов для ЯМР-иммуноанализа на основе магнитных нанокластеров с различной белковой оболочкой.

В главе 4 предложены новые подходы к контролю качества белковых наночастиц, а также детально исследованы их физико-химические свойства. Эти результаты в дальнейшем использованы автором для получения диагностикумов для колориметрического иммуноанализа с контролируемыми и прогнозируемыми свойствами.

В главе 5 продемонстрирован анализ противостолбнячных антител при помощи альбуминовых наночастиц, нагруженных молекулами гемеина, металлопорфирина из активного центра пероксидазы хрена.

В главе 6 описан процесс оптимизации планшетного колориметрического иммуноанализа простатспецифического антигена при помощи диагностикума, представляющего собой конъюгат моноклональных антител с наночастицами берлинской лазури. Берлинская лазурь, будучи координационным соединением железа, является высокоактивным аналогом пероксидазы хрена и с успехом может заменять ее при конструировании колориметрических тест-систем.

В главе 7 автор представил способ получения наночастиц берлинской лазури, которые могут использоваться для создания диагностикумов для планшетного иммуноанализа антител и простатспецифического антигена. Все разработанные иммуноанализы имеют достаточно низкий предел обнаружения для обнаружения указанных мишеней в диапазоне клинически значимых концентраций.

В «Заключении» автор анализирует наиболее важные итоги исследования, обсуждает полученные факты, представляет перспективы дальнейшей разработки темы.

Выводы диссертационного исследования полностью основаны на фактических данных, полученных П.В. Храмцовым, соответствуют цели и задачам работы и достаточно аргументированы.

Практические рекомендации, касающиеся подходов к получению диагностикумов на основе наноматериалов с белковым покрытием, обоснованы и четко сформулированы.

Результаты исследования изложены в автореферате, который оформлен в традиционном стиле и достаточно полно отражает содержание, основные положения и выводы работы.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации. Диссертация Храмцова П.В. посвящена актуальной проблеме иммунологической науки, соответствует паспорту специальности 3.2.7. Иммунология, выполнена на высоком научном и методическом уровне, с верификацией результатов масштабными экспериментальными исследованиями, перспективами внедрения ее результатов в практику и, безусловно, заслуживает положительной оценки. Однако имеются *замечания*, в целом не снижающие высокий научный и методический уровень представленной диссертационной работы: глубина и несомненная новизна результатов диссертационного исследования не всегда по ходу изложения его материалов подкрепляется концептуальными обобщениями, представлением в виде методологии, а акцент на прикладные и экспериментальные аспекты занижает масштабность научно-методических подходов диссертационной работы.

В ходе рецензирования работы возник ряд *вопросов*, которые не умаляют научной ценности диссертации:

1. Насколько актуальны разработанные Вами технологии с точки зрения дальнейшей их коммерциализации (промышленной воспроизводимости)?
2. Насколько настоящее исследование повторяет выполненную работу в рамках подготовки Вами кандидатской диссертации?

3. В работе приведены данные об апробации магнитных нанокластеров (10 образцов сыворотки), а также конъюгатов «берлинская лазурь-желатин А». По какой причине в работе не приведены данные об апробации других синтезированных нанодиагностикомов, в том числе, в сравнительном аспекте с традиционными методическими подходами, а также метрологические характеристики модифицированных методов (чувствительность, селективность, воспроизводимость, предел обнаружения)?

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней. Диссертация Храмцова Павла Викторовича на тему «Применение наночастиц с белковым покрытием в качестве диагностических реагентов для иммуноанализа», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология, является самостоятельно выполненной, законченной научно-квалификационной работой, в которой решена научная проблема получения иммунодиагностикомов на основе наноматериалов, имеющая важное значение для специальности «Иммунология».

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости диссертация Храмцова П.В. полностью соответствует требованиям, установленным разделом II Положения о присуждении ученых степеней, (утв. постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями от 21.04.2016, 02.08.2016 г., 29.05.2017 г., 28.08.2017 г., 01.10.2018 г., 20.03.2021 г., 11.09.2021 г., 26.09.2022 г., 26.01.2023 г., 18.03.2023 г., 26.10.2023 г., 25.01.2024 г.), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

Официальный оппонент:

Заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики
ФБУН «Федеральный научный центр
медико-профилактических технологий управления
рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
доктор медицинских наук

О.В. Долгих

«12» сентября 2024 г.

Подпись д.м.н. Долгих О.В.

ЗАВЕРЯЮ:

Начальник ОК

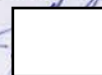
Отдел
кадров
Печать

(подпись)

Название и адрес организации: Федеральное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82. Сайт: <https://fcrisk.ru>. Электронная почта: root@fcrisk.ru. Телефон: +7 (342) 237-25-34.

Отзыв официального оппонента Долгих О.В. поступил «20» сентября 2024 года

Ученый секретарь Совета 24.1.063.01, к.б.н.



Ю.А. Журавлева

С отзывом официального оппонента Долгих О.В. ознакомлен «20» сентября 2024 года

Соискатель



П.В. Храмцов