

Отзыв

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора Карамова Эдуарда 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

В мировой научной литературе широко обсуждается тема использования наночастиц для создания иммуносенсоров и тест-систем. В настоящее время наночастицы активно исследуются и применяются в различных отраслях биомедицины, благодаря ряду уникальных свойств, которые могут быть использованы для создания новых или усовершенствования существующих диагностических средств. Диссертационная работа посвящена актуальной проблеме: применению различных наночастиц, покрытых белковыми молекулами, в качестве альтернативы традиционным диагностикумам. В работе описывается использование наночастиц берлинской лазури, имитирующих свойства пероксидазы хрена, для обнаружения модельных биомаркеров: простатспецифического антигена и противостолбнячных антител. В ходе выполнения диссертации были разработаны диагностикумы на основе магнитных частиц для применения в тест-системах с использованием метода ядерно-магнитного резонанса. В перспективе представленные в работе диагностические реагенты могут стать альтернативой ферментным конъюгатам благодаря своей дешевизне и высокой каталитической активности. Помимо разработки тест-систем, существенное внимание в диссертационном исследовании уделено оптимизации технологий синтеза наночастиц, а также исследованию их физико-химических свойств. На первый взгляд, это не совсем соответствует направлению 3.2.7. Иммунология. Такой подход является полностью обоснованным, поскольку именно глубокое понимание структурных и функциональных особенностей наноматериалов позволяет управлять свойствами диагностикумов и адаптировать для решения конкретных диагностических задач. Актуальности диссертационному исследованию добавляет и тот факт, что в настоящее время существует острая необходимость разработки отечественных тест-систем. Так, например, на данный момент на рынке не представлены тест-системы для обнаружения противостолбнячных антител отечественного производства, несмотря на существующую необходимость мониторинга состояния коллективного иммунитета в регионах.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации. Цель диссертационного исследования - разработка наноразмерных диагностикумов для колориметрического планшетного иммуноанализа и иммуноанализа методом ядерно-магнитного резонанса, для достижения которой были поставлены 4 задачи. В результате исследования

сформулировано 4 положения, выносимых на защиту, и 4 вывода. Обоснованность полученных автором результатов и выводов подтверждается четким дизайном исследования, корректными методами статистической обработки данных, а также большим объемом проанализированных данных. По материалам диссертации опубликовано 19 научных работ, в том числе 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, а также получено 4 патента РФ.

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

Достоверность и новизна исследований, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации. Достоверность результатов исследования подтверждается тем, что в работе использованы современные методы синтеза и исследования структуры наноматериалов: метод динамического светорассеяния, электронная и атомно-силовая микроскопия, рентгенофазовый анализ, элементный анализ. Специфичность диагностикумов подтверждена путем использования различных контрольных образцов, включая контрольные диагностикумы, не содержащие аффинные молекулы, специфичные к молекулам-мишеням. В диссертации использованы адекватные методы статистической обработки данных. Все результаты, представленные в диссертации, опубликованы в ведущих научных журналах.

Впервые были созданы диагностические реагенты для ЯМР-иммуноанализа, которые представляют собой магнитные наночастицы, покрытые желатином, казеином и альбумином. Их свойства были подробно изучены с точки зрения использования в качестве диагностикумов в различных типах ЯМР-анализов, включая магнитные свойства (релаксивность), термостабильность, стабильность в сыворотке и плазме крови, а также эффективность конъюгирования с распознающими молекулами. Впервые в иммуноанализе были использованы диагностические реагенты на основе наночастиц берлинской лазури, обладающих пероксидазоподобной активностью. Были разработаны новые технологические подходы к синтезу альбуминовых и желатиновых наночастиц, которые использовались для создания диагностических реагентов для иммуноферментного анализа.

Значимость полученных результатов для теории и практики. В работе были исследованы физико-химические свойства наноматериалов с разными типами белковых покрытий, что позволяет осуществлять выбор покрытия наноматериалов для решения конкретных диагностических задач. В частности, полученные данные позволяют предсказывать влияние природы белковой оболочки на стабильность при различных рН, склонность к агрегации в физиологических средах, чувствительность к протеолитическим ферментам, проницаемость для хромогенных субстратов. Это

позволяет управлять свойствами диагностических реагентов, а именно размерами нанокompозитов, содержанием каталитически активного компонента, т.е. свойствами, оказывающими непосредственное влияние на форму калибровочной кривой и нижний предел детекции иммуноанализа.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета. Курс «Стереоспецифические взаимодействия» для магистров 2 года обучения, обучающихся по программе 06.04.01 «Биология». 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. Результаты исследования могут помочь разработать диагностические системы на основе наноматериалов с активностью пероксидазы. В процессе исследования было выявлено, что оптимизация состава субстратного буфера значительно снижает предел обнаружения тест-систем. Также было проведено сравнение каталитических свойств пероксидазы хрена и наноматериалов, имитирующих ее действие. Полученные желатиновые наночастицы могут использоваться не только для создания диагностических систем, но и в качестве биосовместимых носителей в биотехнологии, в частности, для создания нового поколения нановакцин.

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 (включающих 2 работы в отечественных и 405 – в зарубежных изданиях).

Во введении автор обосновал важность, новизну и актуальность своего исследования, определил цель и задачи, а также представил ключевые результаты в виде 4 положений, выносимых на защиту.

В обзоре литературы представлен современный спектр наночастиц, использующихся в иммуноанализах. Рассмотрены принципиальные особенности ключевых методов характеристики наночастиц, которые автор применял в ходе выполнения диссертационного исследования.

В главе 2 описаны методы исследования, используемые для синтеза белковых наночастиц и наночастиц, покрытых белками, а также процедуры разработанных иммуноанализов и подходы к их оптимизации.

В главе 3 автор обосновал способ получения диагностикумов для ЯМР-иммуноанализа на основе магнитных нанокластеров с контролируемыми размерами, а также применение диагностикумов в иммуноанализе противостолбнячных антител.

В главе 4 представлены закономерности синтеза и подходы к контролю качества белковых наночастиц. В дальнейшем результаты, полученные на этом этапе работы, использованы для получения диагностикумов для иммуноферментного анализа.

В главе 5 продемонстрирована возможность использования гемина – компонента активного центра пероксидазы хрена – в качестве более стабильной и доступной альтернативы собственно пероксидазе. Были синтезированы диагностикумы, представляющие собой наноразмерные альбуминовые частицы, содержащие многочисленные молекулы гемина, т.е. каталитические центры. Применимость диагностикумов продемонстрирована при помощи разработки теста для количественного определения IgG человека.

Глава 6 представляет собой логичное развитие предыдущих исследований. В данном случае вновь использован уже описанный метод получения диагностикумов, однако гемин заменен на куда более активный катализатор – берлинскую лазурь. Подробно описан процесс оптимизации иммуноанализа простатспецифического антигена при помощи синтезированных диагностикумов.

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

В «Заключении» автор анализирует результаты исследования, обсуждает полученные факты, сопоставляет с литературными данными, представляет перспективы совершенствования методов иммунодиагностики.

Сделанные автором выводы полностью соответствуют поставленным задачам и полученным результатам. Практические рекомендации логично завершают диссертацию.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации. Отличительной особенностью диссертации является то, что существенное внимание в ней уделено способам синтеза и характеристики материалов, используемых для получения иммунодиагностикумов. Подробно исследованы воспроизводимость и масштабирование способов синтеза диагностических реагентов. Такой подход не является избыточным, даже учитывая, что диссертация предлагается к защите по направлению 3.2.7. Иммунология, поскольку одним из основных препятствий на пути трансфера разработок, связанных с наноматериалами, в практическую плоскость, является недостаточная надежность технологий их получения. Очевидно

желание автора показать, что представленные в диссертации разработки обладают потенциалом для практического применения. В то же время, стоит отметить, что ни одна из представленных тест-систем не превосходит имеющиеся на рынке тесты с точки зрения предела обнаружения. Краеугольный камень работы – это использование белковых покрытий для получения диагностикумов. По всей видимости, такой подход действительно дает свои плоды. Храмцов П.В. на многочисленных примерах доказал, что они позволяют решить проблему агрегации наночастиц, в том числе и при длительном хранении. Использование разных белков дает возможность адаптировать диагностикумы под нужды конкретного иммуноанализа.

Серьёзных замечаний по работе не возникло, но есть вопросы, которые не умаляют достоинства данного исследования:

1) В диссертационном исследовании представлены тест-системы для обнаружения IgG человека и простатспецифического антигена. Могут ли разработанные наночастицы быть использованы для выявления других клинически значимых молекул, например, вирусных и бактериальных антигенов?

2) Автор показал возможность использования разных белковых покрытий, однако на этот счет есть достаточное количество работ (многие из которых процитированы в диссертации). Какие новые данные были получены в этом отношении в ходе выполнения диссертационного исследования?

3) Почему автор не провёл прямое сравнение пероксидазных конъюгатов и наночастиц?

4) В работе недостаточно внимания уделено вопросу специфичности тест-систем. Проводились ли исследования, посвященные отсутствию перекрестных реакций?

5) Хотелось бы понять мотив использования аналогов пероксидазы хрена. Пероксидаза отлично зарекомендовала себя за многие годы. Известны и полимерные формы пероксидазы, которые дают усиленный сигнал. Чем обосновано предпочтение использования аналогов вместо пероксидазы хрена?

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней. Диссертация Храмова 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 иммунодиагностикумов на основе наноматериалов, имеющая важное значение для биологии, а именно, для специальности «Иммунология».

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости диссертация 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:

Руководитель отдела общей вирусологии,

Заведующий лабораторией иммунохимии

им. Д. И. Ивановского

ФГБУ «Национальный исследовательский центр

эпидемиологии и микробиологии имени

почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России,

доктор биологических наук, профессор



Э.В. Карамов

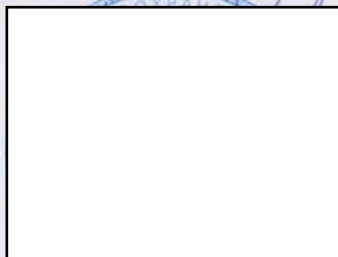
16 сентября 2024 г.

Подпись д.б.н., проф. Карамова Э.В.

ЗАВЕРЯЮ:

Учёный секретарь

Печать



Е.В.Сысолятина

Название и адрес организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава РФ): 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16. Тел.: +7 (925) 358-94-79. e-mail: karamov2004@yandex.ru, сайт: <https://gamaleya.org/>

Отзыв официального оппонента Карамова Э.В. поступил «23» сентября 2024 года

Ученый секретарь Совета 24.1.063.01, к.б.н.



Ю.А. Журавлева

С отзывом официального оппонента Карамова Э.В. ознакомлен «23» сентября 2024 года

Соискатель



П.В. Храмцов