

Отзыв

официального оппонента, Колесниковой Натальи Владиславовны, доктора биологических наук, профессора, профессора кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 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 исследования. Совершенствование методов иммуноанализа позволяет сделать их более привлекательными для врачей и пациентов с точки зрения чувствительности, простоты, оперативности. В этом отношении диссертация П.В. Храмцова представляет собой попытку применить различные наноматериалы как альтернативу традиционным диагностикумам, используемым в ИФА. Использование наночастиц для создания иммуносенсоров и тест-систем является популярной темой в мировой научной литературе. Много современных статей посвящено использованию уникальных свойств люминесцентных наночастиц (по типу квантовых точек), магнитных наночастиц и микросфер, последние из которых уже широко применяются в иммунодиагностике для аффинной очистки иммуноглобулинов, в многоцветных планшетных анализах. Между тем, в работе П.В. Храмцова речь идет о наночастицах, имитирующих свойства пероксидазы хрена в превращениях хромогенного субстрата. Помимо этого, автор описывает процесс разработки диагностикумов на основе магнитных частиц, которые могут быть использованы в тест-системах с использованием метода ЯМР. Показано, что наночастицы берлинской лазури, сходные по каталитическим свойствам с пероксидазой хрена, позволяют обнаруживать такие биомаркеры, как антистолбнячные антитела и простатспецифический антиген в достаточно низких концентрациях, что позволяет заявлять о практической применимости данного подхода. На данный момент нельзя говорить о том, что описанные наночастицы смогут заменить традиционно используемые метки, прежде всего, ферментативные, однако исследования по увеличению их каталитической активности, стабильности и снижению их стоимости несомненно следует признать весьма актуальными и востребованными.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Целью диссертационного исследования Храмцова П.В. была разработка концептуальных подходов (получение, управление свойствами, контроль качества) к созданию диагностических реагентов для иммуноанализов, на основе белковых наночастиц и наноматериалов с белковым покрытием. Для реализации намеченной цели автором были сформулированы 4 весьма емкие задачи, связанные с разработкой твердофазного ЯМР-иммуноанализа для оценки

концентрации иммуноглобулинов в образцах сыворотки; с определением новых подходов к получению и контролю качества иммунодиагностикумов на основе наноразмерных белковых частиц; с разработкой колориметрического иммуноанализа противостолбнячных антител с использованием гемин-содержащих альбуминовых наночастиц и низкомолекулярного миметика пероксидазы хрена, а также ИФА-диагностикума на основе наночастиц берлинской лазури, покрытых желатиновой оболочкой для непрямого анализа противостолбнячных антител и сэндвич-анализа простат-специфического антигена.

В соответствии с поставленными задачами и полученными результатами по итогам диссертации сформулировано 4 положения, выносимых на защиту, и 4 конкретных вывода. Обоснованность полученных автором результатов и выводов подтверждается грамотным дизайном исследования, корректным выбором и применением методов статистической обработки результатов, а также достаточным объемом проанализированных данных. Многие из представленных экспериментов воспроизведены многократно в разных вариациях или в разном масштабе, что позволяет точно оценить степень вариабельности и воспроизводимости результатов.

По материалам диссертации опубликовано 19 научных работ: 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.

В связи с вышеизложенным, научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертации П.В. Храмцова, являются научно обоснованными.

Достоверность и новизна полученных результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается тем, что выводы, сделанные в диссертации, являются результатом анализа большого количества экспериментальных данных. Результаты экспериментов, большинство которых выполнены автором в нескольких повторностях, представлены в виде графиков и таблиц, в которых отражены средние значения и величина разброса каждого анализируемого показателя. Во всех случаях был использован адекватный набор статистических методов исследования, что не позволяет сомневаться в достоверности полученных данных.

В диссертации Храмцова П.В. впервые представлена методология получения диагностических реагентов для анализа методом ЯМР на твердой фазе, позволяющая использовать для анализа полистирольные планшеты, тест-полоски для иммуноблоттинга и иммунохроматографические тест-полоски. Кроме того, автором впервые применены в ИФА диагностические реагенты на основе наночастиц берлинской лазури, имитирующих активность пероксидазы хрена, а также предложены способы синтеза диагностикумов, представляющих собой антительные конъюгаты наноразмерных комплексов различных

белковых молекул и наноматериалов, обладающих пероксидазной активностью. Несомненную новизну полученных результатов исследования подтверждают четыре патента РФ на изобретения, полученных автором.

Значимость для науки и практики результатов диссертации. Теоретическая значимость работы заключается в решении важнейшей научной проблемы по получению стабильных диагностических реагентов для иммуноанализов на основе наноматериалов. При этом важны полученные автором новые знания о свойствах наноматериалов с различными типами белковых покрытий, что необходимо для управления свойствами диагностикумов.

Практическая значимость работы определяется разработкой новых диагностически значимых железоуглеродных наночастиц с белковыми покрытиями для ЯМР-иммуноанализов, отличающихся высокой устойчивостью к агрегации и стабильностью при хранении, а также определением новых технологических подходов к синтезу наноразмерных диагностикумов для ИФА на основе миметиков пероксидазы хрена, инкапсулированных в альбуминовую и желатиновую оболочку, отличающихся высокой каталитической активностью, и более высокой стабильностью и экономичностью по сравнению с ферментными диагностикумами. Практическую значимость имеет разработанный автором способ оптимизации состава растворов хромогенных субстратов, необходимый для снижения предела детекции иммуноанализов, основанных на применении миметиков пероксидазы хрена.

Оценка содержания диссертации. 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 работ в зарубежных изданиях.

Во *Введении* автором показана актуальность, новизна и значимость исследования, сформулированы его цель и задачи, а также представлены положения, выносимые на защиту. В *обзоре литературы* описаны основные группы наноматериалов, использующихся в колориметрических иммуноанализах и иммуноанализах на основе ядерно-магнитного резонанса. Рассмотрены проблемы синтеза и применения в иммунодиагностике наноматериалов с белковым покрытием.

В *Главе 2* достаточно подробно описаны методы исследования: методы ко-преципитации, десольватации и контролируемой агрегации в присутствии белков (для синтеза белковых наночастиц и наночастиц, покрытых белками) и методы характеристики структуры и свойств наночастиц (сканирующая электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия, энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия, динамическое светорассеяние,

рентгенофазовый анализ, дифракция электронов выбранной области, изотермическая адсорбция азота, электрофорез в ПААГ и в агарозе, масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой, времяразрешенная флуоресценция и др.).

В пяти главах с результатами собственных исследований последовательно излагаются результаты, позволившие автору сформулировать 4 основных положения, выносимых на защиту. Так, в Главе 3 описан способ получения диагностикумов для ЯМР-иммуноанализа на основе магнитных нанокластеров с контролируемыми размерами, заключающийся в смешивании растворов белка (альбумина, желатина и казеина) с железоуглеродными наночастицами. Итоговый размер нанокластеров зависит от pH и ионной силы реакционной смеси, а также концентрации и типа белка. Конъюгаты нанокластеров с G белком стрептококка были использованы для количественного обнаружения противостолбнячных антител человека методом ЯМР-иммуноанализа.

В Главе 4 автором исследованы различные подходы к синтезу альбуминовых и желатиновых наночастиц методом десольватации. Получены новые данные о зависимости структуры наночастиц от способа синтеза и характеристик исходного белкового препарата. Проведено сравнение различных методов оценки концентрации белковых наночастиц и сформулированы рекомендации по ее корректной оценке. Представлен новый способ синтеза желатиновых наночастиц, который отличается от известных подходов простотой и универсальностью.

В Главах 5 и 6 показано применение метода десольватации для получения диагностических реагентов для колориметрического количественного иммуноанализа антител и простат-специфического антигена.

В Главе 7 автором представлен способ получения наночастиц берлинской лазури, являющихся миметиками пероксидазы хрена, и покрытых желатиновой капсулой, что представляет собой новый диагностикум для планшетного иммуноанализа антител и простатспецифического антигена. Нижний предел детекции разработанных иммуноанализов является достаточным для обнаружения указанных мишеней в диапазоне клинически значимых концентраций.

В разделе *Заключение* автором приводится научное обобщение всех полученных результатов исследования, и определяются перспективы дальнейшей разработки темы. Сформулированные П.В. Храмцовым «Выводы» полностью соответствуют поставленным задачам, являются весьма корректными и лаконичными, и не вызывают вопросов и возражений.

Содержание автореферата в полной мере отражает содержание текста диссертации.

Рекомендации по использованию данных и выводов диссертации. 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 Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН).

Результаты диссертационного исследования могут быть использованы для разработки диагностических систем на основе наноматериалов с пероксидазной каталитической активностью. Разработанный способ синтеза желатиновых наночастиц может быть применен не только для создания диагностикумов для иммуноанализа, но и для разработки искусственных аналогов межклеточного матрикса при выращивании клеток в традиционных или трехмерных культурах. Кроме того, разработанные соискателем диагностические реагенты могут найти широкое применение в оценке напряженности поствакцинального иммунитета, измерения концентрации иммуноглобулинов в образцах сывороток крови и культуральных сред.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации. Предложенные соискателем новые диагностические материалы и тест-системы на их основе вносят существенный вклад в совершенствование методического арсенала в области клинической и экспериментальной иммунологии для освещения тех их областей, которые в настоящий момент являются скрытыми. Есть основание полагать, что со временем эти тест-системы смогут найти свое место в реальной клинической практике.

Принципиальных замечаний по работе П.В. Храмцова нет, однако при знакомстве с диссертационной работой у оппонента возникли некоторые *вопросы*:

1) Обычно для новых методов иммуноанализа проводится сравнение со стандартными методами, например, иммуноферментным анализом. Почему в Вашей работе нет такого сравнения?

2) В чем преимущество представленных в работе методик? Из литературы известны более чувствительные методы анализа, превосходящие даже существующие коммерческие тест-системы.

3) Наночастицы берлинской лазури, по заявлению автора, обладают высокой пероксидазной активностью, однако в работе нет сравнения эффективности ферментных конъюгатов и конъюгатов на основе наночастиц. Объясните, почему?

4) В диссертационном исследовании для демонстрации работоспособности тест-систем используются два маркера: антитела против столбнячного анатоксина и простатспецифический антиген. Могут ли разработанные методы применяться для обнаружения других антигенов?

Возникшие вопросы не ставят под сомнение научную ценность представленного исследования.

Заключение о соответствии 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 иммунодиагностикумов на основе наноматериалов, имеющая важное значение для биологии, а именно, для специальности «иммунология». Диссертация полностью соответствует требованиям раздела 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 - Храмцов Павел Викторович заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности: 3.2.7. Иммунология.

Официальный оппонент,
профессор кафедры клинической иммунологии,
аллергологии и лабораторной диагностики
факультета повышения квалификации и
переподготовки специалистов ФГБОУ ВО
«Кубанский государственный медицинский университет»
Минздрава России,
д.б.н., профессор

 Н.В. Колесникова

«28» августа 2024 г.

Подпись д.б.н., профессора Н.В. Колесниковой
ЗАВЕРЯЮ



Название и адрес организации: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России), 350063, г. Краснодар, ул. им. Митрофана Седина, д. 4, тел.: +7(918) 625-25-25, e-mail: nvk24071954@mail.ru.

Отзыв официального оппонента Колесниковой Н.В. поступил «02» сентября 2024 г.
Ученый секретарь Совета 24.1.063.01,
к.б.н.



Ю.А. Журавлева

С отзывом официального оппонента ознакомлен «02» сентября 2024 г.
Соискатель



П.В. Храмцов

