

Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение  
«Институт экспериментальной медицины»  
197022, Санкт-Петербург,  
ул. Академика Павлова, д. 12

«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора ФГБНУ «Институт  
экспериментальной медицины»,  
доктор медицинских наук,

П. [Redacted Signature]



### ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности диссертации Крамникова Павла Викторовича на тему «Применение наночастиц с белковым покрытием в качестве диагностических реагентов для иммуноанализа» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

**Актуальность проблемы.** В современных иммунологических исследованиях используются разнообразные аналитические методы: иммуноферментный, иммунофлуоресцентный анализ, электрохемилюминесцентный иммуноанализ, полимеразная цепная реакция, вестерн-блоттинг, масс-спектрометрия и многие другие. Каждый из этих методов позволяет выявлять качественно или количественно маркеры различных заболеваний: белки, гликопротеиды, циркулирующие клетки, внеклеточные везикулы, РНК/ДНК и т.д. Предел обнаружения используемых методов в существенной степени зависит от природы и механизма генерации аналитического сигнала, а также метода его оценки. Так, в иммуноферментном анализе усиление сигнала происходит за счет ферментативной конверсии бесцветного субстрата в окрашенный продукт. Тем не менее, во многих случаях чувствительность традиционных тест-систем оказывается недостаточной. Использование наноматериалов позволяет добиваться существенного снижения предела детекции иммуноанализов. Это обусловлено наличием у наночастиц ряда физико-химических свойств, которые позволяют усиливать аналитический сигнал. Одной из проблем, связанных с применением наноматериалов, является их низкая стабильность в физиологических средах, приводящая к агрегации и потере уникальных свойств. Решение этой задачи является нетривиальным, поскольку должно учитывать целый ряд аспектов, связанных с использованием наночастиц в качестве диагностикумов. Прежде всего, это отсутствие склонности полимерных покрытий к неспецифическим взаимодействиям с компонентами аналитических систем, в первую очередь, иммуносорбентом. Кроме того, полимерные покрытия предоставляют возможность для ковалентного присоединения к наночастицам моноклональных антител или других молекул, обуславливающих взаимодействие с определяемым антигеном. Таким образом, оптимизация структуры полимера и способа покрытия поверхности представляют собой чрезвычайно важную научную проблему, решение которой является критически значимой для использования всего потенциала наноматериалов в иммуноанализах.

Таким образом, работа Храмцова П.В., направленная на оценку применения наночастиц с белковым покрытием в качестве диагностических реагентов для иммуноанализа, является актуальной и востребованной.

**Связь работы с планами соответствующей отрасли науки.** Диссертационная работа П.В. Храмцова выполнена в лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Регистрационный номер НИОКТР 122010800029-1), Российского фонда фундаментальных исследований, в том числе совместно с Правительством Калининградской области и Правительством Пермского края (гранты 16-44-590427, 19-015-00408, 19-415-393005), Российского научного фонда (гранты 17-15-01116, 20-75-00029).

**Научная новизна.** В диссертационном исследовании были предложены инновационные технологические подходы к получению диагностических реагентов для ЯМР-иммуноанализа и иммуноферментного анализа на основе неорганических наночастиц. Ключевым новшеством является использование и сравнительное исследование различных белковых покрытий, а также использование новых способов инкапсулирования наноматериалов в белковые оболочки. Впервые были охарактеризованы свойства диагностикумов, существенные для их практического применения, а именно: каталитическая активность, релаксивность, термостабильность, коллоидная стабильность, неспецифическая адсорбция компонентов сыворотки и плазмы крови, а также эффективность конъюгирования с моноклональными антителами. Впервые были применены в иммуноанализе диагностические реагенты на основе высокоактивных наночастиц берлинской лазури. Эти наночастицы обладают каталитической активностью, аналогичной пероксидазе хрена. Впервые показана возможность конъюгирования таких наночастиц с моноклональными антителами, стрептавидином, белком G. Показано, что желатиновое покрытие обеспечивает отличную коллоидную стабильность диагностикумов, в том числе и при длительном хранении. Впервые была продемонстрирована возможность существенного увеличения аналитического сигнала в колориметрическом иммуноанализе с использованием наноматериалов путем оптимизации состава субстратного буфера. Были разработаны новые технологические подходы к синтезу и контролю качества диагностики на основе альбуминовых и желатиновых наночастиц, которые впоследствии были использованы для количественного обнаружения иммуноглобулинов человека.

**Теоретическая и практическая значимость полученных автором результатов.** В ходе проведения диссертационного исследования получены новые знания о свойствах наночастиц с разными белковыми покрытиями. Это позволяет осуществлять тонкую настройку характеристик наноразмерных диагностических реагентов, изменяя в конечном итоге параметры иммуноаналитических тест-систем, таких как предел обнаружения, диапазон калибровочной кривой, сохранность свойств диагностикумов при перевозке и

хранении. Диссертантом были созданы принципиально новые технологические подходы к получению реагентов для иммуноферментного анализа, представляющие собой функциональные аналоги пероксидазы хрена с белковой (альбуминовой или желатиновой) оболочкой. Преимуществами полученных реагентов является их лучшая физико-химическая стабильность и более низкая себестоимость в сравнении с традиционными ферментными метками. При этом важно отметить, что каталитическая активность этих реагентов сравнима с таковой пероксидазой из корней хрена, являющейся «ферментом выбора» в иммуноферментных анализах. Весьма интересно, что автор диссертационного исследования уделил внимание не только традиционным колориметрическим иммуноанализам, но и новым способам обнаружения биомолекул, а именно, анализу с использованием регистрации ядерно-магнитного резонанса. Этот высокочувствительный метод измерения предъявляет специфические требования к диагностикумам, которые должны осуществлять распознавание иммунных комплексов в толще пористых мембран. Использование белковых реагентов позволило успешно решить эту задачу. Кроме того, было показано, что природа белкового покрытия определяет границы применения диагностикумов, т.е. изменяя тип покрытия, можно существенно увеличить эффективность диагностикумов и адаптировать их к решению конкретных аналитических задач.

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.

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.**

Результаты диссертационного исследования могут быть использованы для разработки и оптимизации твердофазных иммуноанализов.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, 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 распознающие молекулы, специфичные к молекулам-мишеням. Подтверждена воспроизводимость свойств всех диагностических реагентов, полученных в ходе выполнения диссертационного исследования. В диссертации использованы адекватные методы статистической обработки данных. Результаты обсуждены на 18 научных отечественных и международных конференциях, опубликованы в 19 научных работах в том числе 15 – в изданиях, включенных в Перечень ВАК для публикации результатов

диссертационных исследований и индексируемых в МБД Scopus, WoS и RSCI, а также 4 патента РФ.

**Характеристика работы.** 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* автор обосновал важность, новизну и актуальность своего исследования, определил цели и задачи, а также представил ключевые результаты и выводы.

В *обзоре литературы* (Глава 1) обсуждены основные группы наноматериалов, используемых в иммуноанализах, а также проблемы синтеза и применения наноматериалов с белковым покрытием в иммунодиагностике.

В *главе 2* описаны методы исследования, используемые для синтеза белковых наночастиц и наночастиц, покрытых белками. Различные методы, включая сканирующую электронную микроскопию и просвечивающую электронную микроскопию, использовались для оценки структуры и свойств наночастиц.

В *третьей главе* автор описывает способ получения диагностикумов для ЯМР-иммуноанализа на основе магнитных нанокластеров с контролируемыми размерами.

В *главе 4* автор исследовал разные подходы к синтезу альбуминовых и желатиновых наночастиц методом десольватации и обосновал их применение для количественного иммуноанализа антител и простатспецифического антигена.

*Глава 5* посвящена использованию в иммуноанализе противостолбнячных антител диагностикумов на основе альбуминовых наночастиц, содержащих гемин – ключевой компонент каталитического центра пероксидазы хрена.

В *главе 6* представлена разработка и оптимизация иммуноанализа простатспецифического антигена при помощи альбуминовых наночастиц, нагруженных берлинской лазурью, миметиком пероксидазы хрена.

*Главу 7* автор посвятил раскрытию способа получения наночастиц берлинской лазури с увеличенной каталитической активностью, которые могут использоваться для создания диагностикумов для планшетного иммуноанализа антител и простатспецифического антигена.

В *заключении* проанализированы и обобщены полученные диссертантом результаты, соотнесенные с литературными данными.

*Выводы*, сформулированные автором, логично вытекают из полученных результатов и соответствуют поставленным задачам.

*Практические рекомендации* сформулированы четко, адресованы исследователям, занимающимся проблемой получения диагностикумов на основе наноматериалов с белковым покрытием.

**Соответствие автореферата основным положениям диссертации.** Автореферат оформлен в соответствии с требованиями ВАК, логично структурирован, содержит аналитическое изложение наиболее важных результатов работы, заключение и список публикаций по теме диссертации. Все разделы автореферата соответствуют материалам диссертации, ее основным положениям, выводам и практическим рекомендациям.

**Общая оценка, замечания и вопросы.** Следует отметить, что представленная работа носит не только выраженную прикладную направленность, но и весьма существенный фундаментальный характер. Кажущаяся перегруженность диссертации описанием технологических аспектов вполне логично объясняется тем фактом, что полученные результаты, особенно в части привлекательных характеристик покрытых белковым наноразмерных частиц, формируют понимание перспектив не только в разработке инновационных детектирующих реагентов и конструировании на их основе чрезвычайно широкого спектра иммунодиагностических систем. В более широком аспекте, разработанные технологии могут лечь в основу создания надежных и эффективных, а вместе с тем, безопасных конструкций, пригодных для использования в стратегии адресной доставки биологически активных субстанций при терапии различных патологий, а также в *in vivo* диагностике. Нельзя не отметить убедительный по своему качеству список представленных по теме диссертационного исследования опубликованных работ. Из 19-ти публикаций 12 – в зарубежных изданиях 1-го и 2-го квартилей.

По ходу рассмотрения работы замечаний нет, однако возникли некоторые вопросы, которые не влияют на позитивную оценку диссертационного исследования:

1. Насколько широко метод, основанный на использовании ЯМР-релаксометрии, может быть внедрён в практическое здравоохранение?
2. Какие существенные преимущества имеет предлагаемый Вами диагностикум определения простатспецифического антигена перед традиционными методами иммуноферментного анализа?

**Заключение.** Диссертационная работа 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, завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной проблемы, имеющей важное значение для специальности 3.2.7. Иммунология, заключающейся в обосновании и разработке способов получения стабильных иммунодиагностикумов на основе наноматериалов.

По актуальности, содержанию, новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Храмцова П.В. полностью отвечает критериям раздела II «Положения о присуждении ученых степеней» (утв. Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, с изм., утв. 21.04.2016 г. № 335, 02.08.2016 г. № 748, ... ред. 18.03.2023, 25.01.2024), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает

присуждения ему искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании отдела иммунологии Института экспериментальной медицины "29" августа 2024 г., протокол заседания № 206.

Заведующая лабораторией общей иммунологии  
отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» Минобрнауки  
России

Доктор медицинский наук, профессор



Н.Б. Серебряная

Я, Наталья Борисовна Серебряная, даю согласие на обработку моих персональных данных и включение в аттестационное дело диссертанта.



Н.Б. Серебряная

«29» августа 2024 год

Подпись д.м.н., проф. Н.Б. Серебряной  
ЗАВЕРЯЮ

**Контактная информация:**

ФГБГУ «ИЭМ» Минобрнауки России

197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12.

Телефон: 8 (812) 234-68-68

E-mail: [iem@iemspb.ru](mailto:iem@iemspb.ru)

Сайт: <https://iemspb.ru/>

*Подпись Н.Б. Серебряной удостоверено,  
Зам. начальника УРП и ОДО  
ФГБНУ «ИЭМ»*



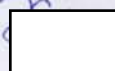
Отзыв ведущей организации – ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» – поступил  
05.09.2024 года

Ученый секретарь Совета 24.1.063.01



Ю.А. Журавлева

С отзывом ведущей организации ознакомлен 05.09.2024 года  
Соискатель



П.В. Храмцов