

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Пермский
федеральный исследовательский
центр Уральского отделения
Российской академии наук,
чл.-корр. РАН, д.ф.-м.н.



О.А. Плехов

июня 2024 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

«Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук

Диссертация Храмцова Павла Викторовича «Применение наночастиц с белковым покрытием в качестве диагностических реагентов для иммуноанализа» выполнена в лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (далее «ИЭГМ УрО РАН»).

В период подготовки диссертации соискатель Храмцов Павел Викторович работал в лаборатории Клеточной иммунологии и нанобиотехнологии «ИЭГМ УрО РАН» в должности старшего научного сотрудника.

В 2012 г. Храмцов П.В. окончил с отличием Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего

профессионального образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет» по специальности «Биология».

Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук по теме «Иммуноаналитическая система для полуколичественной оценки напряженности поствакцинального иммунитета к коклюшу, дифтерии и столбняку» защитил 07.04.2016 в диссертационном совете Д 208.117.03, созданном при ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России. Минобрнауки РФ присуждена ученая степень кандидата биологических наук (приказ: 14.07.2016, № 919/нк-6, диплом серия КНД №023826).

Научный консультант: Раев Михаил Борисович, д.б.н., доцент, заведующий лабораторией Клеточной иммунологии и нанобиотехнологии «ИЭГМ УрО РАН».

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Оценка выполненной работы: В диссертации к.б.н. Храмцова П.В. обоснованы концептуальные подходы к получению диагностических реагентов для иммуноанализа. Диссертация является актуальной законченной самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, в которой автором представлены технологии получения диагностических реагентов для иммуноанализа на основе наноматериалов с белковым покрытием. В диссертации решены поставленные цель и задачи, работа обладает внутренним единством, что подтверждается наличием разработанного плана исследований и взаимосвязи результатов и выводов.

**Личное участие автора в получении результатов, изложенных
в диссертации**

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея, планирование научной работы, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования проводились совместно с научным консультантом. Цель и задачи сформулированы совместно с научным

консультантом. Дизайн исследования разработан лично диссертантом. Анализ современной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме проведен лично диссертантом. Получение и интерпретация экспериментальных данных осуществлялись лично диссертантом.

Инструментальные исследования выполнены совместно с коллегами из различных научных и образовательных учреждений, в частности, в работе использован ЯМР-релаксометр и программное обеспечение, разработанные и изготовленные сотрудниками лаборатории прикладного магнетизма Института физики металлов им. Михеева УрО РАН (г. Екатеринбург), заведующий лабораторией – к.ф.-м.н. Михаил Александрович Уймин. Просвечивающая электронная микроскопия, измерение удельной площади поверхности наночастиц, элементный анализ наночастиц желатина, меченных комплексами европия, выполнены сотрудниками этой же лаборатории. Исследование диагностикумов методом сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионного анализа выполнено старшим научным сотрудником Института технической химии, к.т.н. Дмитрием Михайловичем Кисельковым. Элементный анализ наночастиц берлинской лазури выполнен заведующим лабораторией химического мониторинга объектов окружающей среды кафедры аналитической химии и экспертизы химического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета (далее – ПГНИУ) к.х.н. Александром Сергеевичем Максимовым и сотрудником лаборатории биогеохимии техногенных ландшафтов Естественного института ПГНИУ Алексеем Юрьевичем Пузиком. Лиганды для синтеза флуоресцентных комплексов европия любезно предоставлены с.н.с. кафедры органической химии химического факультета ПГНИУ к.х.н. Екатериной Евгеньевной Храмцовой. Рекомбинантный белок G был любезно предоставлен в.н.с. лаборатории функциональной геномики и протеомики микроорганизмов Института экспериментальной медицины (Санкт-Петербург), д.б.н. Татьяной Витальевной Гупаловой. Эксперименты по синтезу наночастиц берлинской лазури с разным размером, характеристики

магнитных наночастиц и желатиновых наночастиц выполнены сотрудниками лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии «ИЭГМ УрО РАН», г. Пермь, заведующий лабораторией, д.б.н. Михаил Борисович Раев. Атомно-силовая микроскопия магнитных наночастиц выполнена при помощи сотрудников лаборатории алканотрофных микроорганизмов «ИЭГМ УрО РАН», г. Пермь, заведующий лабораторией, академик РАН Ирина Борисовна Ившина.

Статистическая обработка первичных данных, интерпретация и анализ полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации осуществлялось соискателем лично. Основные положения диссертации представлены в виде научных публикаций и докладов на научно-практических мероприятиях соискателем как лично, так и в соавторстве с сотрудниками лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии «ИЭГМ УрО РАН».

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что результаты получены на сертифицированном оборудовании. Для обеспечения достоверности и воспроизводимости результатов большинство экспериментов выполнены в нескольких реальных или технических проворностях. Для анализа данных использованы корректные методы статистической обработки. Большая часть данных, включая необработанные данные с приборов, касающиеся свойств диагностикумов, результатов подгонки калибровочных кривых, результатов анализа образцов находятся в открытом доступе. Все результаты, представленные в диссертации, опубликованы в ведущих международных научных журналах.

Новизна и практическая значимость

Впервые разработаны диагностические реагенты для ЯМР-иммуноанализа, представляющие собой магнитные наночастицы, покрытые желатином, казеином и альбумином. Впервые были всесторонне изучены их свойства, существенные для использования в качестве диагностикумов в

различных типах ЯМР-анализов, в частности, магнитные свойства (релаксивность), термостабильность, стабильность в сыворотке и плазме крови, эффективность конъюгирования с распознающими молекулами.

Впервые применены в иммуноанализе диагностикумы на основе высокоактивных наночастиц берлинской лазури «искусственная пероксидаза», обладающих каталитической активностью, аналогичной таковой пероксидазы хрена. Показано, что желатиновое покрытие позволяет конъюгировать такие наночастицы с моноклональными антителами, стрептавидином, белком G, а также обеспечивает высокую стабильность диагностикумов при длительном хранении.

Впервые продемонстрирована возможность существенного увеличения аналитического сигнала в колориметрическом иммуноанализе с использованием наноматериалов за счет оптимизации состава субстратного буфера.

Разработаны новые технологические подходы к синтезу и контролю качества диагностикумов на основе альбуминовых и желатиновых наночастиц, которые в дальнейшем были использованы для количественной детекции иммуноглобулинов человека и онкомаркера - простатспецифического антигена.

Теоретическая значимость работы. В ходе проведения диссертационного исследования получены новые знания о характеристиках наноматериалов с различными типами белковых покрытий. Эти новые знания позволяют управлять теми свойствами диагностических реагентов на основе наноматериалов, которые оказывают непосредственное влияние на аналитические и технологические параметры иммуноанализов: нижний предел детекции, форму калибровочной кривой, стабильность диагностикумов при хранении и транспортировке и т.д.

Практическая значимость работы. Разработаны технологические подходы к синтезу реагентов для иммуноферментного иммуноанализов, представляющие собой миметики пероксидазы хрена инкапсулированные в

альбуминовую и желатиновую оболочку. Такие реагенты являются более дешевыми и доступными альтернативами пероксидазе хрена. Полученные наночастицы обладают высокой каталитической активностью, сравнимой с таковой пероксидазы хрена. Железоуглеродные наночастицы, стабилизированные белковыми молекулами были с успехом использованы для твердофазного ЯМР-иммуноанализа. Разработаны подходы к совершенствованию иммуноанализов, в частности показан простой и эффективный способ снижения предела детекции, базирующийся на подборе оптимального состава субстратного буфера.

Ценность научных работ соискателя

Ценность научных работ Храмцова П.В. заключается в новых инструментах для исследования функций иммунной системы, прежде всего гуморального иммунного ответа. Научные работы Павла Викторовича опубликованы в центральных и региональных изданиях. Публикации используются в научной деятельности ученых, занимающихся проблемами клинической иммунологии и вакцинопрофилактики, в практике работы врачей-иммунологов, а также в учебном процессе. Общее число цитирований его публикаций в РИНЦ – 264, индекс Хирша – 8; индекс Хирша в МБД Scopus – 9, цитируемость – 271. Ценность научных работ соискателя подтверждается также получением 4 патентов на изобретение РФ, грантов Российского научного фонда и Российского фонда фундаментальных исследований, участием в научно-практических мероприятиях XIV Конференция иммунологов Урала с международным участием (Челябинск, 2017), Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2018), II Международная научная конференция «Высокие технологии, определяющие качество жизни» (Пермь, 2018), International Conference on Biotechnology and Bioengineering (Будапешт, 2018), ACS Publications Symposium: Innovation in Materials Science and Technology (Сингапур, 2019), Международный форум "Биотехнологии: состояние и перспективы развития. Науки о жизни" (Москва, 2019), VI Всероссийская

конференции с международным участием: Техническая химия. От теории к практике (Пермь, 2019), Материалы XI Всероссийского конгресса молодых ученых – биологов с международным участием Симбиоз - Россия (Пермь, 2019), Объединённый иммунологический форум (Новосибирск, 2019), Международная научная конференция «Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии» (Екатеринбург, 2020), VII Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2020), XII Всероссийский конгресс молодых ученых - биологов с международным участием «Симбиоз - Россия 2020» (Пермь, 2020), XXII Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2021), XII Международная конференция молодых ученых «Менделеев 2021» (Санкт-Петербург, 2021), Первая школа по медицинской химии для молодых ученых (Новосибирск, 2021), XXIII Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2022), IV школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (Казань, 2022), VI Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (Екатеринбург, 2022).

Научная специальность, которой соответствует диссертация

Областью исследования представленной научной работы Храмцова Павла Викторовича является разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов, а также разработка и усовершенствование методов оценки качества постинфекционного и поствакцинального иммунитета, эффективности и безопасности новых вакцинных препаратов.

Указанная область и способы исследования соответствуют научной специальности 3.2.7. Иммунология.

Связь диссертационной работы с планами НИР, участием в грантах

Тема диссертации утверждена решением ученого совета, протокол № 5 от 26.12.2022 г.

Диссертационная работа выполнялась в рамках комплексной темы НИР «Поиск и селекция новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии. Создание иммунохимических диагностических систем» (№ государственной регистрации НИОКТР 122010800029-1) и по грантам 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), а также Российского научного фонда (гранты 17-15-01116, 20-75-00029). Ее результаты вошли в отчеты по НИР «ИЭГМ УрО РАН».

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Соискатель имеет 70 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации - 17 научных работ, из них 13 работ опубликовано в рецензируемых научных изданиях.

Соискателем опубликованы 13 статей и 4 патента общим объемом 12 печатных листов, авторский вклад 23 % (*указываются научные работы только по теме диссертации*).

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Khramtsov P. Albumin nanoparticles loaded with hemin as peroxidase mimics for immunoassay / P. Khramtsov, M. Bochkova, V. Timganova, D. Kiselkov, S. Zamorina, M. Rayev // ChemistrySelect. – 2022. – Т. 7, № 3. – P. e202103892.
2. Khramtsov P. Synthesis and application of albumin nanoparticles loaded with prussian blue nanozymes / P. Khramtsov, M. Kropaneva, M. Bochkova, V. Timganova, D. Kiselkov, S. Zamorina, M. Rayev // Colloids and Interfaces. – 2022. – Т. 6, № 2. – P. 29.

3. Khramtsov P. Prussian blue nanozymes with enhanced catalytic activity: size tuning and application in ELISA-like immunoassay / P. Khramtsov, M. Kropaneva, A. Minin, M. Bochkova, V. Timganova, A. Maximov, A. Puzik, S. Zamorina, M. Rayev // *Nanomaterials*. – 2022. – T. 12, № 10. – P. 1630.
4. Khramtsov, P. Measuring the concentration of protein nanoparticles synthesized by desolvation method: Comparison of Bradford assay, BCA assay, hydrolysis/UV spectroscopy and gravimetric analysis / P. Khramtsov, T. Kalashnikova, M. Bochkova, M. Kropaneva, V. Timganova, S. Zamorina, M. Rayev // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2021. – № 599. – P. 120422.
5. Khramtsov, P. Modified desolvation method enables simple one-step synthesis of gelatin nanoparticles from different gelatin types with any bloom values / M. Bochkova, V. Timganova, S. Zamorina, M. Rayev, O. Burdina, S. Lazarev, A. Novokshonova, D. Kiselkov, A. Minin // *Pharmaceutics*. – 2021. – T. 13, № 10 – P. 1537
6. Khramtsov, P. Nuclear magnetic resonance immunoassay of tetanus antibodies based on the displacement of magnetic nanoparticles / P. Khramtsov, M. Kropaneva, M. Bochkova, D. Kiselkov, V. Timganova, S. Zamorina, M. Rayev // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2021. – T. 413, № 5. – P. 1461-1471.
7. Khramtsov P. Solid-phase nuclear magnetic resonance immunoassay for the prostate-specific antigen by using protein-coated magnetic nanoparticles / P. Khramtsov, M. Kropaneva, M. Bochkova, V. Timganova, S. Zamorina, M. Rayev // *Microchimica Acta*. – 2019. – T. 186. – P. 1-7.
8. Khramtsov P. Magnetic nanoclusters coated with albumin, casein, and gelatin: Size tuning, relaxivity, stability, protein corona, and application in nuclear magnetic resonance immunoassay / P. Khramtsov, I. Barkina, M. Kropaneva, M. Bochkova, V. Timganova, A. Nechaev, I. Byzov, S. Zamorina, A. Yermakov, M. Rayev // *Nanomaterials*. – 2019. – T. 9, № 9. – P. 1345.
9. Khramtsov P. Conjugation of carbon coated-iron nanoparticles with biomolecules for NMR-based assay / P. Khramtsov, M. Kropaneva, I. Byzov, A. Minin, A. Mysik, V. Timganova, M. Bochkova, M. Uimin, S. Zamorina,

A. Yermakov, M. Rayev // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2019. – Т. 176. – P. 256-264.

10. Khramtsov P. Dot immunoassay for the simultaneous determination of postvaccination immunity against pertussis, diphtheria, and tetanus / P. Khramtsov, M. Bochkova, V. Timganova, S. Zamorina, M. Rayev, // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2017. – Т. 409. – P. 3831-3842.

Рекомендации к защите диссертации с учетом научной зрелости

Храмцов Павел Викторович – сформировавшийся научный работник. Диссертационная работа Храмова П.В. является самостоятельно выполненным научно-квалификационным исследованием, которое вносит существенный вклад в специальность 3.2.7. Иммунология, т.к. в исследовании решена значимая для биологической отрасли науки проблема, а именно проблема получения стабильных иммунодиагностикомов на основе наноматериалов, имеющей важное значение для биологии.

Диссертационная работа Храмова П.В. по актуальности проблемы, новизне результатов, научно-практическому значению соответствует требованиям раздела II «Положения о присуждении учёных степеней» (утв. Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, с изм., утв. от 30.07.2014 № 723, 21.04.2016 г. № 335, 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, ... ред. 25.01.2024 г.), а ее автор достоин присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

Диссертация Храмова Павла Викторовича «Применение наночастиц с белковым покрытием в качестве диагностических реагентов для иммуноанализа» рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по научной специальности 3.2.7. Иммунология.

Заключение принято на заседании проблемной комиссии «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пермского федерального исследовательского центра

Уральского отделения Российской академии наук».

Присутствовало на заседании 12 чел. Результаты голосования:
«за» - 12 чел., «против» - 0 чел., «воздержалось» - 0 чел., протокол № 2 от «31»
мая 2024 г.

Председатель проблемной комиссии,
директор «ИЭГМ УрО РАН»,
д.м.н., профессор



С.В. Гейн