

Федеральное государственное учреждение
**«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»**

119071 Россия, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2. Тел.: (495) 954-5283; факс: (495) 954-2732; www.fbras.ru; e-mail: info@fbras.ru

30.09.2016 № 12304-9311-911

На № _____

УТВЕРЖДАЮ:

Директор
Федерального государственного
учреждения «Федеральный
исследовательский центр
«Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии
наук»



В.О. Попов

"30" сентября 2016 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
на диссертационную работу Сотникова Дмитрия Васильевича
«Определение специфических антител методом иммунохроматографии: количественные
закономерности и практические приложения»

Диссертация «Определение специфических антител методом
иммунохроматографии: количественные закономерности и практические приложения»
выполнена в лаборатории иммунобиохимии Федерального государственного
учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук» (далее ФИЦ Биотехнологии РАН), до июля

2015 г. – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н.Баха Российской академии наук.

Сотников Д.В. в 2007 г. окончил Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева по специальности «Химия». В декабре 2007 г. поступил в очную аспирантуру Учреждения Российской академии наук Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, которую закончил в декабре 2010 г.

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в 2015 г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук.

Тема диссертационной работы утверждена на заседании Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, протокол № 10 от 18 декабря 2014 г..

Научные руководители диссертационной работы: доктор химических наук, профессор, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией иммунобиохимии ФИЦ Биотехнологии РАН Дзантиев Борис Борисович и кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФИЦ биотехнологии РАН Российской академии наук» Жердев Анатолий Виталиевич.

Подготовленная Д.В. Сотниковым диссертационная работа была представлена 27 сентября 2016 года на совместном семинаре лабораторий иммунобиохимии, биомедицинских исследований, химической энзимологии и биохимии стрессов микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН. По итогам обсуждения работы дана следующая оценка работы:

1. Актуальность темы и направленность исследования.

Иммунохимические тест-системы широко используются в медицинской и ветеринарной диагностике, позволяя достоверно установить наличие в биоматериале как антигена инфекционного агента, так и специфических антител к нему. Для ряда болезней контроль специфических антигенов и антител является основным средством диагностики.

Серодиагностический метод основан на определении в крови специфических антител к антигенам возбудителя заболевания. В ответ на присутствие в организме инфекционного агента иммунная система вырабатывает специфические иммуноглобулины, обнаружение которых часто более предпочтительно, чем непосредственное определение возбудителя или его антигенов.

Особенно перспективной для массового использования представляется серодиагностика в формате иммунохроматографического анализа (ИХА), который может проводиться во внелабораторных условиях, не требует оборудования, высокой

квалификации персонала и позволяет получать результат обследования за 10-15 мин. Высокая экспрессность и методическая простота ИХА определили широкое распространение данного метода для решения различных диагностических задач. Однако по аналитическим характеристикам ИХА зачастую уступает альтернативным методам. Существующие ограничения ИХА определяют потребность в создании новых подходов, позволяющих улучшить аналитические характеристики метода и, таким образом, повысить достоверность ИХ-серодиагностики.

2. Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации.

Личный вклад Д.В. Сотникова в представленную диссертационную работу заключался в проведении научных экспериментов, разработке и анализе моделей, обработке и интерпретации полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций.

3. Степень достоверности результатов исследований.

Достоверность представленных в диссертации данных определяется использованием современных физико-химических методов исследования и статистической обработки результатов. Заключение о диагностических результатах, полученных с использованием разработанных тест-систем, подтверждались данными видеоцифровой регистрации и анализа изображений, что исключает субъективность их интерпретации. Препараты сывороток, использованные в ходе апробации тест-систем, были предварительно охарактеризованы альтернативными аналитическими методами..

4. Новизна результатов, полученных лично автором.

В рамках диссертационной работы впервые предложены математические модели иммунохроматографической серодиагностики и разработаны новые методические решения для улучшения аналитических параметров тест-систем.

Разработаны методики определения состава конъюгатов коллоидного золота с рецепторными молекулами и определения степени сохранения функциональных свойств рецепторных молекул после иммобилизации на поверхность коллоидного золота. С использованием разработанных методик получены новые данные о механизме формирования белковых оболочек вокруг частиц коллоидного золота.

Предложены оригинальные схемы проведения ИХА, позволяющие улучшить чувствительность серодиагностики. Экспериментально подтверждена эффективность этих подходов для определения специфических антител.

5. Практическая значимость диссертации и использование полученных результатов.

Разработаны системы иммунохроматографической серодиагностики бруцеллеза крупного рогатого скота и легочного туберкулеза людей. Рекомендации по повышению диагностической эффективности тест-систем имеют общий характер и могут применяться при разработке других систем иммунохроматографической серодиагностики.

Разработаны новые подходы к определению состава и связывающей способности конъюгатов коллоидного золота с рецепторными молекулами. Полученные данные об иммобилизации белков на коллоидном золоте позволяют повысить аналитическую эффективность данных конъюгатов.

Предложенная математическая модель дает возможность оценить влияние различных факторов на характеристики тест-систем, и, таким образом, упростить разработку иммунохроматографических методов анализа.

6. Научная специальность, которой соответствует диссертационная работа.

Представленная Сотниковым Д.В. диссертационная работа посвящена синтезу, характеристике и аналитическому применению меченых рецепторных биомолекул, моделированию иммунохимических взаимодействий в проточных системах и применению полученных результатов в иммунодиагностике. Исследования проведены с использованием комплекса современных биохимических методов. Содержание диссертационной работы полностью соответствует специальности 03.01.04 Биохимия.

7. Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах.

По материалам диссертационной работы опубликовано 11 статей в российских и иностранных журналах, 5 тезисов конференций, получено 7 российских и иностранных патентов на изобретения.

Перечень опубликованных по материалам диссертации работ удовлетворяют требованиям пункта 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

Все основные результаты проведенных исследований представлены в публикациях:

Статьях:

1. Sotnikov D.V., Radchenko A.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Determination of the composition and functional activity of the conjugates of colloidal gold and antibodies. Eurasian Journal of Analytical Chemistry. 2016, v. 11, N 3, pp. 169-179.

2. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development and application of a label-free fluorescence method for determining the composition of gold nanoparticle–protein conjugates. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, v. 16, No 1, pp. 907-923.
3. Sotnikov D.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Eskendirova S.Z., Baltin K.K., Mukanov K.K., Ramankulov E.M., Sadykhov E.G., Dzantiev B.B. Express immunochromatographic detection of antibodies against *Brucella abortus* in cattle sera based on quantitative photometric registration and modulated cut-off level. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2015, v. 36, No 1, pp. 80-90.
4. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Surface plasmon resonance based biosensors. In book: *Nanobiosensors for Personalized and Onsite Biomedical Diagnosis* (Editor Dr. Pranjali Chandra). Stylus Publishing, Sterling, USA. ISBN: 978-1-84919-950-6. 624 pp. Chapter 30. P. 497-518.
5. Сотников Д.В., Жердев А.В., Авдиенко В.Г., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографическая серодиагностика туберкулеза с использованием конъюгата коллоидное золото – антиген. *Биотехнология*, 2015, N 2, сс. 76-81.
6. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Детекция межмолекулярных взаимодействий, основанная на регистрации поверхностного плазмонного резонанса. *Успехи биологической химии*. 2015, т. 55, сс. 391-420.
7. Кудеяров Ю.А., Голубев С.С., Малюченко В.М., Жердев А.В., Смирнова Н.И., Сотников Д.В. Разработка метрологического комплекса для аттестации существующих и вновь разрабатываемых экспресс-тестов. Метод градуировочных характеристик для построения калибровочных кривых экспресс-тестов. *Российские нанотехнологии*. 2013, т. 8, № 7-8, сс. 105-109.
8. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Альтернативный способ иммунохроматографической серодиагностики с использованием конъюгата антигена с коллоидным маркером. *Прикладная аналитическая химия*, 2013, т. 4, № 2 (10), сс. 26-33.
9. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Староверова Н.П., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Применение иммунохроматографического анализа для серодиагностики бруцеллеза крупного рогатого скота. *Российский ветеринарный журнал*.
10. Малюченко В.М., Киселева Ю.В., Короленко Я.А., Жердев А.В., Таранова Н.А., Берлина А.Н., Смирнова Н.И., Сотников Д.В. Метод калибровочных кривых для иммунохроматографических экспресс-тестов. *Законодательная и прикладная метрология*. 2012, Т. 119, № 4, сс. 29-32.
11. Голубев С.С., Дзантиев Б.Б., Жердев А.В., Киселева Ю.В., Короленко Я.А., Кудеяров Ю.А., Малюченко В.М., Смирнова Н.И., Сотников Д.В. Метод калибровочных кривых для иммунохроматографических экспресс-тестов. Ч. 1.

Патентах:

1. Сотников Д.В., Жердев А.В., Бызова Н.А., Дзантиев Б.Б. Патент Российской Федерации на изобретение № 2395092 от 17 сентября 2008 г. Дата публикации = 27 марта 2010 г.
2. Сотников Д.В., Ескендирова С.З., Дзантиев Б.Б., Бызова Н.А., Балтин К.К., Жердев А.В., Раманкулов Е.М., Муканов К.К., Булашев А.К., Шенжанов К.Т., Унышева Г.Б. Инновационный патент № 25460 на изобретение. Дата регистрации в Государственном реестре изобретений Республики Казахстан – 20 января 2012 г.
3. Сотников Д.В., Ескендирова С.З., Дзантиев Б.Б., Бызова Н.А., Жердев А.В., Балтин К.К., Унышева Г.Б., Булашев А.К., Муканов К.К., Раманкулов Е.М. Инновационный патент № 25922 на изобретение. Дата регистрации в Государственном реестре изобретений Республики Казахстан – 29 июня 2012 г.
4. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Патент Российской Федерации на изобретение № 2523393 от 19 марта 2013 г. Дата публикации – 23 мая 2014 г.
5. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Патент Российской Федерации на изобретение № 2530560 от 28 июня 2012 г. Дата публикации – 14 августа 2014 г.
6. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Патент Российской Федерации на изобретение № 2532352 от 28 июня 2012 г. Дата публикации – 10 ноября 2014 г.
7. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Патент Российской Федерации на изобретение № 2545909 от 19 марта 2013 г. Дата публикации – 10 апреля 2015 г.

и 5 тезисах в материалах российских и международных конференций, симпозиумов и конгрессов.

Результаты проведенных исследований:

1. Охарактеризованы процессы иммобилизации на коллоидном золоте белков разного размера и молекулярной массы - иммуноглобулина G человека (IgG), бычьего сывороточного альбумина (БСА), рекомбинантного белка G стрептококка (белок G) и соевого ингибитора трипсина (СИТ). С применением разработанного метода, основанного на измерении флуоресценции триптофана в составе белков, определены предельные значения адсорбции белков на частице коллоидного золота диаметром 24

нм, составляющие 52, 90, 500, 550 молекул соответственно для Ig G, БСА, белка G и СИТ при pH иммобилизации 5,4.

2. Исследовано влияние pH среды иммобилизации на сорбцию белков на коллоидное золото. Показано, что при изменении pH от 5,4 до 8,3 увеличивается максимальное количество сорбируемых молекул БСА на частице коллоидного золота, что может быть связано с переходом от формирования монослоя белка на поверхности коллоидного золота к полислойной иммобилизации.

3. Определена степень сохранения функциональной активности антител, иммобилизованных на поверхности золотых наночастиц, с использованием разработанной методики, основанной на иммуноферментном анализе. Установлено, что в конъюгатах коллоидного золота с антивидовыми антителами способность связываться с антигеном сохраняют около 12% антигенсвязывающих центров.

4. Разработана математическая модель определения антител методом иммунохроматографии. Установлена зависимость кинетики образования детектируемого иммунного комплекса от концентраций реагентов и параметров межмолекулярных взаимодействий в ходе анализа. На основании анализа модели предложены рекомендации по оптимизации условий определения специфических антител. Показано, что увеличение регистрируемого сигнала и снижение предела обнаружения антител можно достигать разбавлением анализируемого образца до 100 раз.

5. Предложены две новые методики для иммунохроматографического определения специфических антител. В первом случае на поверхность коллоидного маркера и на мембрану сорбируется антиген, во втором – коллоидное золото конъюгируется с антигеном, а в аналитической зоне сорбируется белок А. Показано, что применение данных схем позволяет снизить предел обнаружения антител в диагностике легочного туберкулеза.

6. Разработаны иммунохроматографические тест-системы для экспрессной (время анализа 10 минут) серодиагностики легочного туберкулеза людей с применением в качестве антигена белка Rv0934 и бруцеллеза крупного рогатого скота с применением в качестве антигена липополисахарида *Brucella abortus*.

Диссертационная работа «Определение специфических антител методом иммунохроматографии: количественные закономерности и практические приложения»

Сотникова Дмитрия Васильевича рекомендуется к защите на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, и является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержатся решения актуальных задач, имеющих существенное значение для развития биохимии:

- установлены закономерности процесса взаимодействия коллоидного золота с белками;
- разработаны теоретические модели иммунохроматографических систем;
- разработаны новые подходы к проведению иммунохроматографического определения специфических антител

Считать диссертационную работу завершённой, выполненной на современном уровне. Рекомендовать диссертационному совету Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе ФИЦ Биотехнологии РАН принять к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия диссертацию Сотникова Дмитрия Васильевича «Определение специфических антител методом иммунохроматографии: количественные закономерности и практические приложения» (научные руководители д.х.н. Дзантиев Б.Б. и к.б.н. Жердев А.В.).

Работа соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, и соответствует профилю данного диссертационного совета.

Заключение принято на совместном семинаре лабораторий иммунобиохимии, биомедицинских исследований, химической энзимологии и биохимии стрессов микроорганизмов путем проведения открытого голосования. Присутствовало 32 чел. Результаты голосования: «за» = 32 чел., «против» = нет, «воздержалось» = нет; протокол № 10 от 27 сентября 2016г.

Председатель совместного семинара
Заведующий лабораторией химической энзимологии,
Д.б.н., проф.

 Ярополов А.И.

Секретарь совместного семинара
Научный сотрудник лаборатории иммунобиохимии,
к.б.н.

 Зверева Е.А.

