

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Сотникова Дмитрия Васильевича «Определение специфических антител методом иммунохроматографии: количественные закономерности и практические приложения», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 - Биохимия

Иммунохимические тест-системы, и прежде всего иммунохроматографические полоски привлекают огромное внимание как исследователей-разработчиков, так и практиков, работающих в различных областях, уникальным сочетанием простоты, дешевизны и эффективности. При этом большинство работ направлено на разработку тест-систем для определения целевых аналитов в определенных матрицах. Авторы варьируют различные характеристики иммунореагентов, оптимизируют параметры компонентов теста, добиваясь требуемой чувствительности и максимальной воспроизводимости. При этом систематической проработке факторов, влияющих на аналитические характеристики, практически не уделяется внимание.

Особенно важно установление количественных закономерностей и разработка практических приложений в серодиагностических методах, основанных на определении в крови специфических антител к антигенам возбудителя заболевания. Определение таких антител затруднено большим количеством одновременно присутствующих других антител и белков, которые могут существенно искажать результаты определения. Для массового использования особенно актуальна серодиагностика в формате иммунохроматографического анализа, который не требует использования дорогостоящего оборудования, высокой квалификации персонала и может проводиться во внелабораторных условиях.

В связи с этим диссертационная работа Сотникова Д.В., посвященная изучению факторов, влияющих на аналитические параметры систем иммунохроматографической серодиагностики, математическому описанию данных систем и применению установленных закономерностей для повышения чувствительности иммунохроматографических систем для серодиагностики, является актуальной.

Научная новизна диссертации состоит в том, что впервые предложены математические модели функционирования систем иммунохроматографической серодиагностики и новые методические решения для улучшения их аналитических параметров; разработаны оригинальные методики определения состава конъюгатов коллоидного золота с рецепторными молекулами, а также определения степени сохранения функциональных свойств рецепторных молекул после иммобилизации на поверхность коллоидного золота. Разработанные методики позволили получить новые данные о механизме формирования белковых оболочек вокруг частиц коллоидного золота. Предложены оригинальные схемы иммунохимического анализа, позволяющие улучшить чувствительность серодиагностики; эффективность этих подходов для определения специфических антител подтверждена экспериментально.

Практическая значимость диссертации состоит в том, что разработаны системы иммунохроматографической серодиагностики легочного туберкулеза людей и бруцеллеза крупного рогатого скота, апробированные на большом количестве как положительных, так и отрицательных проб; полученные закономерности повышения эффективности тест-систем имеют общий характер и могут применяться при разработке систем иммунохроматографической серодиагностики; разработаны новые подходы к определению состава и связывающей способности конъюгатов коллоидного золота с рецепторными молекулами; установлены закономерности иммобилизации белков на коллоидном золоте, которые позволяют повысить аналитическую эффективность получаемых конъюгатов; предложенные математические модели позволяют оценить влияние различных факторов на характеристики тест-систем и дать общие рекомендации для разработки иммунохроматографического анализа специфических антител.

Диссертационная работа изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 56 рисунков и 8 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и списка литературы (190 источников).

Во введении сформулированы цель и задачи исследования, обоснованы актуальность, научная новизна и практическая значимость диссертационной работы.

Глава 1 содержит обзор литературы, в котором обобщены сведения, описывающие общие закономерности иммунохроматографии; способы получения и характеристики коллоидного золота – основного маркера в иммунохроматографическом анализе; измерения констант иммунохимических взаимодействий; подходы к моделированию взаимодействий иммунореагентов в иммунохроматографических тестах; средства диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота и туберкулеза людей. Обзор литературы достаточно полно освещает текущее состояние дел в вопросах, решению которых посвящена диссертация.

В главе 2 дано подробное описание использованных в исследовании реагентов, аппаратуры, методик синтеза и проведения экспериментов. Приведенные сведения по большей части позволяют детально воспроизвести полученные результаты.

В главе 3 представлены результаты и обсуждение экспериментов по получению и характеристике коллоидного золота и его конъюгатов с белками, количественному описанию взаимодействий антиген–антитело, разработке и апробации различных форматов иммунохроматографического определения специфических антител. Также представлены результаты разработки и анализа математических моделей иммунохроматографической серодиагностики.

Результаты исследований Д.В. Сотникова прошли широкую апробацию. По материалам диссертации опубликовано 11 статей в российских и иностранных журналах и 5 тезисов конференций, получено 5 российских патентов на изобретения и 2 патента Республики Казахстан.

Тем не менее, необходимо отметить некоторые замечания по работе:

1. В обзоре литературы уделено большое внимание таким вопросам, как синтез коллоидного золота, принципы работы сенсоров, основанных на эффекте поверхностного плазмонного резонанса, и системы Viacore. При этом непосредственно важным для работы вопросам, таким как методы определения характеристик связывания белков с коллоидным золотом, факторы, влияющие на параметры иммунохроматографических тестов, в том числе систем иммунохроматографической серодиагностики, математическое описание данных систем – уделено лишь незначительное внимание. Примеры применения метода поверхностного плазмонного резонанса для получения информации о кинетических и равновесных параметрах формирования специфичных комплексов в литературном обзоре отсутствуют.

2. Автором описан синтез трех образцов коллоидного золота. Не совсем понятно, проводили всего три синтеза и полученные три порции коллоидов использовали на протяжении всех лет экспериментальной работы, или синтезы по одной и той же методике повторяли. Отсутствие этих сведений не позволяет оценить воспроизводимость результатов синтеза и, соответственно затрудняет понимание универсальности выводов на основе дальнейших исследований.

3. Автором получен интересный факт – кривые зависимости количества молекул белков, сорбированных на одной наночастице, от концентрации белка при синтезе выходят на насыщение при концентрации белка в растворе около 70 мкг/мл, однако нигде не обсуждаются возможные причины данного явления. Возможно, графики были бы более информативны, если была приведена не весовая (мкг/мл), а молярная концентрация белка в растворе.

4. Особый интерес представляет характеристика состава и функциональной активности коллоидных конъюгатов, а именно определение состава конъюгатов коллоидного золота с антителами и степени сохранения связывающей способности антител после конъюгации с коллоидным золотом, проведенные в работе. Однако напрямую не указано, как данные результаты использовали при разработке тестов для диагностики заболеваний.

5. Таблица 2, стр. 53. Не указано, как проводились измерения оптической плотности и в каких единицах приведены полученные значения. Табл. 8. Нагляднее было бы представить данные в виде интервалов значений.

6. В ряде случаев не указано число параллельных измерений и не приведен доверительный интервал (табл. 5, 6; рис. 20, 22, 25, 30 и некоторые другие).

Тем не менее, сделанные замечания не снижают положительной оценки диссертации. Диссертационная работа Сотникова Д.В. выполнена на современном теоретическом и экспериментальном уровне. Автореферат диссертации и публикации автора в достаточной мере отражают содержание диссертации.

По актуальности, объему исследований, новизне и практической значимости диссертационная работа Сотникова Д.В. на тему «Определение специфических антител методом иммунохроматографии: количественные закономерности и практические приложения» удовлетворяет всем критериям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, соответствует требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней»,

утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, как научная работа, в которой содержится решение задачи, важной для теории и практики иммунохимических методов, диссертация представляет собой законченное исследование, а ее автор, Сотников Д.В., заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 - Биохимия.

Доктор химических наук по специальности 02.00.02,
доцент, профессор кафедры общей и неорганической химии
ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский
государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»
г. Саратов, 410012, Астраханская, 83.
88452516959,
goryachevaiy@mail.ru

Горячева Ирина Юрьевна

