

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Яркова Сергея Петровича на диссертацию Сотникова Дмитрия Васильевича на тему «Определение специфических антител методом иммунохроматографии: количественные закономерности и практические приложения», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 –Биохимия

Диссертационная работа Сотникова Д.А. посвящена совершенствованию метода иммунохроматографического анализа исходя из количественных характеристик и реакционной способности иммунохимических реагентов, а именно - разработке различных форматов иммунохроматографических тестов для выявления специфических антител к возбудителям туберкулеза и бруцеллеза, в сыворотке крови человека и животных.

Актуальность проведенного исследования не вызывает сомнений и определяется тем, что автором диссертации предложен логичный путь конструирования иммунохроматографических тестов путем количественного определения свойств конъюгатов наночастиц и антител с помощью методов физико-химического анализа - просвечивающей электронной микроскопии, измерения флуоресценции, оптической плотности, применения метода поверхностного плазмонного резонанса. Разработанный в диссертации методологический подход имеет универсальное значение и позволяет его экстраполировать на разработку других тест-систем.

Для достижения высоких характеристик любой аналитической системы необходимы количественные параметры - кинетические и равновесные константы формирования комплексов конъюгат-аналит, знание спектральных и размерных характеристик наночастиц и конъюгатов, а также функциональной активности реагентов. Одной из главных задач совершенствования иммунохимического анализа является переход от экспериментального подбора условий анализа к целенаправленному конструированию тест-систем, основанному на знании молекулярных

характеристик реагентов их взаимодействий в иммунохимической системе. Диссертационная работа Сотникова Д.А. это ещё один результативный шаг в этом направлении.

В этой связи представляется своевременной и полностью соответствующей требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», сформулированная цель диссертационной работы – изучение факторов, влияющих на параметры систем иммунохроматографической серодиагностики, математическое описание данных систем и применение установленных закономерностей для повышения чувствительности серодиагностики.

Для достижения цели автором диссертации была проделан большой объем экспериментальной работы:

- были синтезированы четыре препарата коллоидного золота и детально исследованы их свойства, а также свойства конъюгатов коллоидного золота с иммуноглобулинами и другими белками (БСА, СИТ, белок G);

- изучен молекулярный состав конъюгатов белков и НКЗ на основе методики измерения разности интенсивности флуоресценции триптофанильных аминокислотных остатков в составе молекул белков до, и после реакции конъюгации;

- исследована степень сохранения функциональной активности рецепторных молекул в составе конъюгатов;

- определены кинетические и равновесные константы процессов связывания конъюгатов с аналитами;

- предложены различные схемы конструкции иммунохроматографических тест-систем для серодиагностики;

- сделана попытка математически описать кинетику формирования иммунных комплексов в иммунохроматографических системах, предназначенных для серодиагностики.

Приведенные в диссертации теоретические и экспериментальные результаты получены соискателем впервые и, в совокупности, представляют

новизну выполненной соискателем работы, которая состоит в том, что автором разработаны новые методологические решения для улучшения аналитических параметров иммунохроматографических тест-систем и проведено математическое моделирование определения специфических антител (в рамках предложенных упрощений и приближений) при проведении иммунохроматографического анализа.

В диссертации решается содержательная научная проблема, имеющая большую практическую значимость: совершенствование иммунохроматографического формата иммунохимического анализа с целью создания тест-систем на основе иммунохроматографии для серодиагностики бруцеллеза и туберкулеза. Указанные тест-системы имеют практическое народно-хозяйственное значение, как для медицины, так и для ветеринарии. Их применение позволяет проводить предварительный мониторинг заболеваемости людей и животных, тем самым улучшая качество медицинской и ветеринарной помощи, что имеет социальный и экономический эффект.

На защиту соискателем вынесены следующие положения и результаты:

1. Определение состава конъюгатов коллоидного золота с белками, основанное на измерении люминесценции триптофановых остатков.
2. Определение степени сохранения функциональной активности антител, после сорбции на коллоидном золоте.
3. Закономерности влияния pH иммобилизации белка на коллоидном золоте на процесс сорбции и количество сорбируемых молекул белка.
4. Математическая модель функционирования иммунохроматографических систем для серодиагностики в неравновесных условиях протекания иммунохимических реакций.
5. Иммунохроматографические тест-системы для определения специфических антител против антигена Rv 0934 *Mycobacterium tuberculosis* и липополисахарида *Brucella abortus*.

Анализ материалов, изложенных в диссертации, позволяет сделать заключение о том, что научные положения и результаты, выносимые на защиту,

а также выводы, обоснованы теоретически и экспериментально, достоверны, что подтверждается достаточной полнотой анализа рассматриваемой проблемы, использованием комплекса апробированных экспериментальных методов исследования, статистической обработкой и корректным анализом достигнутых результатов.

К положительным чертам представленного исследования необходимо отнести использование комплекса современных физико-химических методов: просвечивающей электронной микроскопии, флуориметрии, спектрофотометрии, биосенсорного (на основе плазмонного резонанса) определения кинетических и равновесных констант связывания иммунореагентов, иммуноферментного анализа, видеоцифровых методов регистрации, компьютерных программ моделирования конъюгатов. Применённый комплекс методов обеспечил получение объективных и всесторонних данных о размерах, составе и реакционной способности маркерных наночастиц и их конъюгатов с антителами и другими белками, имеющими рецепторные свойства. В свою очередь эти данные послужили фундаментом для создания и оптимизации иммунохроматографических тест-систем. В диссертации прослеживается последовательный и логически оправданный подход к достижению цели. Объем представленного в диссертации экспериментального и теоретического материала значителен и превышает типичные показатели для диссертации на соискание ученой степени кандидата наук.

Диссертация имеет внутреннее единство и логику изложения, что свидетельствует о личном вкладе соискателя в решаемую задачу.

Основные результаты диссертации Сотникова Д.В.. опубликованы в 11 статьях в рецензируемых журналах, 5 патентах Российской Федерации и 2 патентах Республики Казахстан. Экспериментальные и теоретические результаты, полученные диссертантом, были представлены научному сообществу в виде докладов на научных конференциях, в том числе и с

международным участием, конгрессах и съездах в 2008- 2016 гг. Всего таких материалов опубликовано 6.

Автореферат диссертации построен традиционно и соответствует по структуре требованиям ГОСТ Р 7.0.11-2011 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления». Автореферат адекватно отражает основные теоретические и экспериментальные результаты, изложенные в диссертационной работе, написан ясным языком. Иллюстративные материалы (рисунки и таблицы) автореферата дают объективное представление о полученных экспериментальных результатах.

Несмотря на общее положительное впечатление о представленной работе она не лишена определенных недостатков, которые сформулированы в следующих замечаниях:

1. При формулировании решаемых задач исследования последняя и предпоследняя задачи (с. 6, абзацы 3 и 4 снизу) по смыслу представляют собой одно и то же и могли бы быть объединены.

2. Излишне много внимания в обзоре литературы уделено описанию физических принципов работы сенсора *Viasor* на основе поверхностного плазмонного резонанса и приемам работы с ним (с. 21-30). Измерения кинетических констант методом ППР уже давно являются рутинными.

3. Используемая автором методика определения количество молекул белка адсорбированного на единичной наночастице коллоидного золота, основана на измерении разности интенсивности люминесценции триптофановых аминокислотных остатков белка в растворе до, и после конъюгации. Хорошо известно, что на величину интенсивности люминесценции флуорофоров в растворах влияют многие причины, например, наличие соединений способных к тушению люминесценции, рН среды, комплексообразование с ионами металлов и другие факторы. Измерение разностных величин интенсивности люминесценции, даже при соблюдении геометрии для различных образцов, также имеет определенную погрешность,

иногда значительную. Автор приводит величины погрешности измерений на графиках зависимости флуоресценции белков от изначально добавленной концентрации белка в калибровочных растворах (рис. 15). Было бы оправданным, провести расчет погрешности определения количества адсорбированных молекул белка на частице золя (N), вычисленных диссоциативных констант равновесия, которые приведены в таблице 4, а также оценить точность предложенной методики в целом.

4. В изложении собственной математической модели процессов, происходящих при иммунохроматографическом анализе, автор не приводит никаких аналогий с уже существующими моделями (например, Anal. Biochem. 2003 v. 322 89-98. S. Qian, H.H. Bau. «A mathematical model of lateral flow bioreactions applied to sandwich assays»), не подчеркивает отличий или сходства (в части первоначальных допущений и конечных формул) своей модели от известных в литературе. Это может создать ложное впечатление, что работа является пионерской в своем роде.

5. При обсуждении собственных результатов, полученных для серодиагностических тест-систем, отсутствует сравнение показателей аналитической и диагностической чувствительности с аналогичными тестами, доступными коммерчески. Например, для иммунохроматографических тестов предназначенных для серодиагностики туберкулеза имеется исчерпывающий обзор ВОЗ «Laboratory-based evaluation of 19 commercially available rapid diagnostic tests for tuberculosis». (Diagnostics evaluation series-2) ISBN 9789241597111.

Подобное сравнение позволило бы более объективно оценить уровень работы.

6. В тексте диссертации встречаются ошибки оформительского характера, а именно:

на с. 12 в уравнении восстановления хлорида золота цитратом натрия отсутствуют стехиометрические коэффициенты, в этом же уравнении стоит значок обратимости реакции, что принципиально неверно, т.к. в результате

реакции образуется углекислый газ и металлическое золото; на рис. 2 приведен постадийный механизм синтеза коллоидного золота, при этом в уравнениях отсутствует материальный баланс (рис. 2 уравнения А и В); неудачное выражение (с. 15, 3-я строчка сверху) «...повысить температуру до 90%.....»; отсутствуют квадратные скобки при концентрации реагентов в уравнении 8, 8а, 9, 10 и далее по тексту, круглые скобки в показателе степени в знаменателе и числителе дроби (с. 95, формула 11), круглые скобки в формуле (с. 103, формула 38).

Тем не менее, указанные недостатки не снижают общей положительной оценки диссертационной работы.

Вывод. Диссертация Сотникова Дмитрия Васильевича на тему «Определение специфических антител методом иммунохроматографии: количественные закономерности и практические приложения» по совокупности изложенных экспериментальных и теоретических данных, обладающих внутренним единством, актуальности, новизне, практической значимости, а также личному вкладу автора, соответствует п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.00.2013 г. № 842, и паспорту специальности 03.01.04 –Биохимия, а соискатель достоин присуждения ученой степени кандидата химических наук.

Официальный оппонент,
начальник отдела спектральных
методов анализа Федерального
государственного унитарного
предприятия «Государственный
научно-исследовательский институт
биологического приборостроения»,
доктор биологических наук
по специальности (03.02.08-экология)



С.П. Ярков

Подпись Яркова С.П. заверяю:

Начальник отдела кадров ФГУП «ГосНИИБП»

Е.Н. Лютикова

21 ноября 2016 г.

