

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № ____

Решение диссертационного совета от «13» декабря 2016 г. протокол №16 о
присуждении Сотникову Дмитрию Васильевичу, гражданину Российской
Федерации, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация Сотникова Дмитрия Васильевича на тему "Определение специфических антител методом иммунохроматографии: количественные закономерности и практические приложения", представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия, принята к защите 10 октября 2016 года (протокол № 14) диссертационным советом Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2. Совет утвержден Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ №2249-1602 от 16.11.2007 г. с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013 г. №74/нк и от 10.02.2014 г. №55/нк и с учётом переименования Совета от 30.09.2015 г. №1166/нк.

Соискатель Сотников Дмитрий Васильевич, 1984 года рождения, в 2007 г окончил Российский химико-технологический университет (РХТУ) имени Д.И. Менделеева по специальности «химия». В декабре 2007 года поступил в очную аспирантуру Учреждения Российской академии наук Института биохимии им. А.Н.Баха РАН, где проходил обучение по декабрь 2010 года. С декабря 2010 года работал в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимии им. А.Н.Баха Российской академии наук в должности и.о. младшего научного сотрудника. С апреля 2014 года принят на должность научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии им. А.Н.Баха Российской академии

наук. С июля 2015 года по настоящее время работает на должности научного сотрудника Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Диссертационную работу Сотников Д.В. выполнял в лаборатории иммунобиохимии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научные руководители – доктор химических наук, профессор Дзантиев Борис Борисович, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», лаборатория иммунобиохимии, заведующий, и кандидат биологических наук, Жердев Анатолий Виталиевич, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», лаборатория иммунобиохимии, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Горячева Ирина Юрьевна, доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», химический факультет, профессор кафедры общей и неорганической химии

Ярков Сергей Петрович, доктор биологических наук, Федеральное государственное унитарное предприятие "Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения", начальник отдела спектральных методов анализа

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук в своём положительном заключении, подписанном заведующим лабораторией термодинамики биосистем, доктором биологических наук, профессором Розенфельдом Марком Александровичем, указала, что по актуальности темы, объёму проведенных исследований, научной новизне и практической значимости диссертация Д. В. Сотникова является законченной работой высокого теоретического и экспериментального уровня, замечания носят частный характер и не влияют на обоснованность положений диссертации, выносимых на защиту. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям, которые установлены для кандидатских диссертаций «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24

сентября 2013 г. № 842, а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Обоснованность выбора официальных оппонентов определяется тем, что Горячева И.Ю. является известным ученым в области аналитических методов, биометок и наносистем; имеет научные и учебно-методические работы в области иммунохимических и тест-методов анализа (автор более 100 научных работ); Ярков С.П. является известным ученым в области иммуноанализа; имеет научные и методические работы в области разработки иммунохроматографических тест-систем (автор более 40 публикаций)..

Выбор ведущей организации обоснован активно ведущимися исследованиями в областях кинетики и молекулярных механизмов биохимических реакций, моделировании сложных биохимических процессов, а также исследованиями количественных основ физических и химических процессов в биополимерах, полимерных композитах, наноматериалах.

Материалы диссертации отражены в опубликованных автором 11 статьях и 7 патентах. Количество публикаций и требования к изданиям удовлетворяют пункту № 11 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

Статьи:

1. 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, N 1, pp. 80–90.

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, N 1, pp. 907–923.

3. 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.

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 Pranjali Chandra). Stylus Publishing, Sterling, USA. 2016. ISBN: 978-1-84919-950-6. 624 pp. Chapter 30. P. 497–518.

5. 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. Иммунохроматографические экспресс-тесты с коллоидным золотом. Метрология. 2012, № 10, сс. 14–29.

6. 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.

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. Сельскохозяйственные животные. 2013, № 3, сс. 15–18.

10. Сотников Д.В., Жердев А.В., Авдиенко В.Г., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографическая серодиагностика туберкулеза с использованием конъюгата коллоидное золото – антиген. Биотехнология, 2015, № 2, сс. 76–81.

11. 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.

Патенты:

1. Жердев А.В., Бызова Н.А., Сотников Д.В., Дзантиев Б.Б. Способ определения антител к возбудителю туберкулеза. Патент Российской Федерации на изобретение № 2395092 от 17 сентября 2008 г. Дата публикации – 27 марта 2010 г.

2. Ескендирова С.З., Дзантиев Б.Б., Бызова Н.А., Сотников Д.В., Балтин К.К., Жердев А.В., Раманкулов Е.М., Муканов К.К., Булашев А.К., Шенжанов К.Т., Унышева Г.Б. Экспресс-способ серологической диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота на основе иммунохроматографического анализа. Инновационный патент № 25460 на

изобретение. Дата регистрации в Государственном реестре изобретений Республики Казахстан – 20 января 2012 г. (Заявка на патент № 035510 от 23 декабря 2010 г.).

3. Ескендирова С.З., Дзантиев Б.Б., Бызова Н.А., Сотников Д.В., Жердев А.В., Балтин К.К., Унышева Г.Б., Булашев А.К., Муканов К.К., Раманкулов Е.М. Способ экспресс-обнаружения и идентификации *Brucella abortus* в биологическом материале на основе иммунохроматографического анализа. Инновационный патент № 25922 на изобретение. Дата регистрации в Государственном реестре изобретений Республики Казахстан – 29 июня 2012 г. (Заявка на патент № 023098 от 23 августа 2011 г.).

4. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Тест-полоска для высокочувствительного иммунохроматографического анализа. 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. Метод получения межмолекулярных конъюгатов для иммунохроматографического определения специфических антител. 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. Способ проведения иммунохроматографического анализа для серодиагностики. 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. Способ иммунохроматографического определения специфических антител. Патент Российской Федерации на изобретение № 2545909 от 19 марта 2013 г. Дата публикации – 10 апреля 2015 г.

Материалы конференций:

1. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Экспрессный иммунохроматографический метод серодиагностики туберкулеза. Сборник тезисов II Международной научной конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», Ростов-на-Дону, 8–10 октября 2008 г., сс. 145–146.

2. Бызова Н.А., Сотников Д.В., Жердев А.В., Ескендирова С.З., Балтин К.К., Дзантиев Б.Б. Разработка иммунохроматографических тестов для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота. Материалы II Международной конференции «Астана Биотех 2011», 10–11 октября 2011 г., Астана, Казахстан, с. 113.

3. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографические тест-системы для серодиагностики бруцеллеза крупного рогатого скота. Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014», Москва, 18–20 марта 2014 г., т. 2, сс. 451–452.

4. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Экспрессная серодиагностика туберкулеза на основе конъюгатов наночастиц с антигеном rv0934 *Mycobacterium tuberculosis*. Материалы VIII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 17–20 марта 2015 г., часть 1, с. 144–146.

5. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Флуориметрический метод определения состава конъюгатов золотых наночастиц с белками. V Съезд биофизиков России. Ростов-на-Дону, Южный Федеральный Университет, 4–10 октября 2015 г. Материалы докладов, том 1, с. 334–335.

На диссертационную работу Д.В. Сотникова поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора химических наук, профессора Горячевой Ирины Юрьевны (положительный).

Отзыв содержит следующие замечания:

В обзоре литературы уделено большое внимание таким вопросам, как синтез коллоидного золота, принципы работы сенсоров, основанных на эффекте поверхностного плазмонного резонанса, и системы *Biacore*, 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.

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.

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.

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.

Таблица 2, стр. 53. Не указано, как проводились измерения оптической плотности и в каких единицах приведены полученные значения.

Табл. 8. Данные более наглядно представить в виде интервалов значений.

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

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, Яркова Сергея Петровича (положительный).

Отзыв содержит следующие замечания:

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.

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

Используемая автором методика определения количества 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 растворе влияют многие факторы, например, наличие соединений со способностью тушения люминесценции, pH 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 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.

В изложении собственной математической модели процессов, происходящих в 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 bio-reactions 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.

При обсуждении собственных результатов, полученных для серодиагностических 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» (Biagnostic evaluation series-2) ISBN 9789241597111. Подобное сравнение позволило бы более объективно оценить уровень работы.

В тексте диссертации встречаются ошибки оформительского характера, а именно:

На стр. 12 в уравнении восстановления хлорида золота отсутствуют стехиометрические коэффициенты, в этом же уравнении стоит значок обратимости реакции, что принципиально неверно, т.к. в результате реакции образуются углекислый газ и металлическое золото; на рис. 2 приведен поэтапный механизм синтеза коллоидного золота, при этом в уравнениях отсутствует материальный баланс (рис. 2 уравнения А и В); неудачное выражение (стр. 15, 3-я строчка сверху) (...повысить температуру до 90%...); отсутствуют квадратные скобки при концентрации реагентов в

уравнениях 8, 8а, 9, 10 и далее по тексту, круглые скобки в показателе степени, в знаменателе и числителе дроби (стр. 95, формула 11), круглые скобки в формуле (стр. 103, формула 38).

Отзыв Ведущей организации - Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (положительный)

Отзыв содержит следующие замечания:

Диссертант резонно отмечает в литературном обзоре разнообразие бруцелл и значительную степень видоспецифичности вызываемых ими заболеваний. Однако из рассмотрения тест-системы для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота, непосредственно разработанной диссертантом, остается неясным: применима ли она для диагностики бруцеллеза других животных.

Диссертант выделяет два участка на кривых Скетчарда, для которых определяются равновесные константы диссоциации. При этом остается неясным, как может интерпретироваться наличие двух констант взаимодействия: происходят ли при изменении поверхностной плотности сорбированных белков какие-либо изменения их структуры и ориентации или же в ходе сорбции последовательно формируется несколько субпопуляций белковых молекул, взаимодействующих с поверхностью коллоидного золота с разными константами.

Из рассмотрения предлагаемой им модели автор работы отмечает, что общепринятое для иммунохроматографической серодиагностики 2-4-кратное разведение проб сывороток (крови) недостаточно для высокочувствительной детекции специфических антител к целевому антигену, и предлагает использовать существенно большие разведения - в сто и более раз. Однако из текста диссертации остается неясным, как определить разведение, оптимальное для решения той или иной диагностической задачи. От каких параметров это разведение зависит? Как методически можно осуществить такое разбавление без усложнения процедуры анализа?

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Осипова Александра Павловича, кандидата химических наук, доцента кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова;

Решетилова Анатолия Николаевича, доктора химических наук, профессора, заведующего лабораторией биосенсоров и Быкова Александра Геннадьевича, младшего научного сотрудника лаборатории биосенсоров ФГБУН Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;

Безгина Вячеслава Михайловича, доктора биологических наук, профессора, генерального директора ФКП «Курская биофабрика - фирма «БИОК».

Жарниковой Ирины Викторовны, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора;

Хлебцова Николая Григорьевича, доктора физико-математических наук, профессора, заведующего лабораторией нанобиотехнологии ФГБУН Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН;

Муканова Касыма Касеновича, доктора ветеринарных наук, профессора, заместителя генерального директора РГП «Национальный центр биотехнологии» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан и Мукантаева Канатбека Найзабековича, доктора биологических наук, заведующего лабораторией иммунохимии и иммунобиотехнологии РГП «Национальный центр биотехнологии» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан;

Федюкиной Галины Николаевны, кандидата химических наук, старшего научного сотрудника лаборатории нанобиотехнологии отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Козицыной Алисы Николаевны, кандидата химических наук, доцента кафедры аналитической химии Химико-технологического института Уральского федерального университета им. Первого Президента России Б.Н. Ельцина. Отзыв содержит вопрос и замечание: стр. 6: каким образом определяли содержание частиц коллоидного золота в реакционной среде; стр. 19 рис. 9: не приведено значение коэффициента корреляции;

Комарова Александра Анатольевича, доктора биологических наук, профессора, заместителя директора ФГБУ "Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов", руководителя

Испытательного центра, заведующего отделением фармакологических лекарственных средств для животных, безопасности пищевой продукции и кормов и Ирины Сергеевны Нестеренко, кандидата химических наук, заместителя заведующего отделом безопасности кормов и кормовых добавок ФГБУ "Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов". Отзыв содержит замечание: в тексте реферата указано, что было получено три препарата коллоидного золота и установлены их характеристики. Далее по тексту не указано, проводили ли синтез конъюгатов со всеми препаратами коллоидного золота или только с одним, как написано в автореферате в разделе «Получение конъюгатов коллоидного золота с белками», и не дано объяснение, почему был выбран именно этот препарат коллоидного золота (с размером 24 нм);

Понаморева Ольга Николаевна, доктора химических наук, заведующей кафедрой биотехнологии ФГБОУ ВПО Тульского государственного университета. Отзыв содержит замечание: в таблице 1 доверительные интервалы к значениям представлены с двумя значащими цифрами, а сами значения округлены неправильно;

Медянцевой Эльвины Павловны, доктора химических наук, профессора кафедры аналитической химии ФГАОУ ВПО Казанского (Приволжского) федерального университета. Отзыв содержит замечание: в автореферате не указано, какие процессы отвечают за такой интересный эффект, как полислойная иммобилизация белка на коллоидном золоте в щелочных растворах.

Шманай Вадима Владимировича, кандидата химических наук, заведующего лабораторией химии биоконъюгатов Института физико-органической химии НАН Беларуси. Отзыв содержит замечания: Поскольку синтез описанных конъюгатов происходит за счет электростатической сорбции белков на заряженной поверхности коллоидного золота и в автореферате уделено много внимания этой части исследования, представляется недостающим анализ полученных результатов с точки зрения значения изоэлектрических точек белков и заряда белковых глобул в зависимости от величины pH. В части, посвященной определению остаточной связывающей способности антител, не указана величина pH, при которой получали конъюгаты. Более того, процент сохраненной активности вполне может зависеть от значения pH сорбции, поскольку изменение поверхностного заряда белковой молекулы может приводить к изменению ориентации её в пространстве при иммобилизации. В тексте автореферата встречаются неудачные формулировки. Например, «использовали 10 кратный концентрат конъюгата» (с. 19).

Согласитесь, если использовать 10 кратный концентрат в количестве в 10 раз меньше, то получится то же самое. Очевидно, автор имел в виду 10-кратный избыток?

Шумянцевой Виктории Васильевны, доктора биологических наук, заведующей лабораторией биоэлектрохимии отдела персонализированной медицины ФГБНУ "Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича" Отзыв содержит замечания: отсутствуют пояснения при выборе наночастиц золота из трех полученных препаратов (20, 24, 48 нм), а именно – частиц с диаметром 24 нм (стр. 5). На рис. 2 по оси ординат не обозначена размерность связанного белка (стр. 8). При определении кинетических и равновесных параметров взаимодействия антиген-антитело методом поверхностного плазмонного резонанса не указан тип иммобилизации при получении сенсограмм (стр. 11). CM5 чипы предусматривают ковалентную иммобилизацию компонента.

Хамата Хафизовича Валиева, кандидата физико-математических наук, руководителя отдела микроскопии ФГБУ Института прикладной механики РАН. Отзыв содержит замечания: Желательно было бы в диссертации подчеркнуть значительный вклад отечественных исследователей в разработке новейших практических серодиагностических тест-систем. При оценке наноразмерных характеристик коллоидного золота с помощью просвечивающей электронной микроскопии не ясно, на какой конкретно модели микроскопа проведено исследование. Желательно было бы в тексте работы в явном виде указать величины диаметров пор использованных иммунохроматографических мембран. Эти параметры также являются ключевыми факторами в определении эффективности ИХА.

В дискуссии принимали участие:

профессор, д.б.н., Юрина Надежда Петровна;
профессор, д.б.н., Капрельянц Арсений Сумбатович;
профессор, д.б.н., Вейко Владимир Петрович;
к.м.н., Свиридов Валерий Васильевич
профессор, д.б.н., Крицкий Михаил Сергеевич.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты**:

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 количества адсорбируемых белков на частице коллоидного золота диаметром 24 нм, составляющие 52, 90, 500, 550 молекул соответственно для IgG, 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 частицы к полислойной иммобилизации.

3. Определена степень сохранения функциональной активности антител, иммобилизованных на поверхности частиц коллоидного золота, 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 изучения модели предложены рекомендации по оптимизации условий определения специфических антител. Показано, что увеличение регистрируемого сигнала и снижение предела обнаружения антител могут достигаться разбавлением анализируемой пробы сыворотки крови до 100 раз.

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

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

Практическая и теоретическая 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.

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.

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

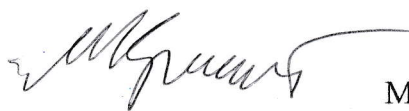
Личный вклад Д.В. Сотникова в представленную диссертационную работу заключался в проведении научных экспериментов, разработке и анализе моделей, обработке и интерпретации полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций.

Диссертационная работа Д.В. Сотникова выполнена на высоком методическом уровне с привлечением современных методов исследования и является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием большого количества публикаций в рецензируемых изданиях (11 статей) и 7 патентов на изобретения.

На заседании 13 декабря 2016 года Диссертационный совет принял решение присудить Сотникову Дмитрию Васильевичу ученую степень кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 13 докторов биологических наук, 4 доктора химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: «за» присуждение ученой степени кандидата химических наук - 18, «против» - нет, недействительных бюллетеней – нет.

Заместитель председателя Диссертационного
совета ФИЦ Биотехнологии РАН,
доктор биологических наук, профессор



М.С. Крицкий

Ученый секретарь Диссертационного
совета ФИЦ Биотехнологии РАН,
кандидат биологических наук



А.Ф. Орловский

13.12.2016