

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
**«Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)**

142290, г. Пушкино Московской обл., проспект Науки, д.3.
Тел. (495)632-78-68, тел/факс: (4967)73-26-36 e-mail: info@pncbi.ru
http://www.psn.ru
ОКПО02699688, ОГРН 1025007768983, ИНН/КПП 5039002841/503901001

15.05.2019 № 191-01-2115/200

На № _____ от _____

«Утверждаю»

ВРИО Директора Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки "Федеральный
исследовательский центр Пушкинский
научный центр биологических
исследований Российской академии
наук"



д.ф-м.н. П.Я. Грабарник

« 15 » мая 2019 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Панфёрова Василия Геннадьевича «Изучение взаимодействия антител с вирусными и бактериальными антигенами для создания экспрессных методов определения фитопатогенов», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия»

Иммунохимические методы анализа (в частности, иммунохроматографический анализ) успешно применяются в медицине, сельском

хозяйстве, контроле качества продуктов питания и т.д. Основными преимуществами этих методов являются высокая специфичность определения, быстрота анализа. Количественные закономерности иммунохимических взаимодействий, определяющие чувствительность анализа, изучены в литературе не в полной мере. Особенно сложны в этом отношении корпускулярные антигены с большим количеством повторяющихся поверхностных антигенных детерминант – такие как вирусы и бактерии. Ключевой элемент для понимания этих закономерностей – всесторонняя характеристика реакций, приводящих к формированию детектируемых в анализе иммунных комплексов. Данное состояние современных биоаналитических разработок определяет **актуальность** диссертационной работы В.Г. Панфёрова.

В работе **строго сформулированы цели и задачи** исследования, а представленные к защите материалы свидетельствуют об их успешном решении. Проведенное исследование посвящено изучению влияния различных факторов на предел обнаружения иммунохроматографических систем детекции бактериальных и вирусных фитопатогенов. Рассмотрены кинетические процессы формирования иммунных комплексов в проточных системах. Проведена характеристика состава и структуры агрегатов, формирующихся при взаимодействии корпускулярных антигенов с антителами. На основании изученных иммунохимических взаимодействий и выявленных факторов, определяющих чувствительность анализа, диссертантом предложен ряд новых решений для снижения предела обнаружения.

В рамках работы убедительно продемонстрировано **использование результатов исследования для практических целей**. Разработанные на основании проведенных исследований тест-системы для определения основных патогенов картофеля успешно апробированы совместно с сотрудниками профильных организаций – ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха и Всероссийского центра карантина растений.

Диссертация В.Г. Панфёрова состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, заключения и списка литературы. Работа изложена на 156 страницах, включает 77 рисунков, 16 таблиц и

231 литературный источник. Следует отметить целостное и последовательное изложение результатов исследования.

Во введении обусловлена необходимость разработки высокочувствительных методов иммунохроматографического анализа фитопатогенов.

В литературном обзоре представлены основные подходы к снижению предела обнаружения иммунохроматографического анализа, характеристика фитопатогенов как аналитов, определяемых иммунохимическими методами. Материал хорошо систематизирован, охватывает ключевые исследования последних лет. Подготовленный литературный обзор формирует необходимый базис для интерпретации полученных диссертантом результатов, оценки их новизны и значимости.

Глава «Материалы и методы» посвящена описанию выполненных диссертантом экспериментов и использованных для этого реагентов и оборудования. Следует отметить, что диссертант, наряду с базовыми биохимическими и иммунохимическим, овладел широким спектром современных исследовательских методов: атомно-силовой микроскопией, просвечивающей электронной микроскопией, динамическим лазерным светорассеянием, ассиметричным фракционированием в поле поперечных сил и др., что свидетельствует о его высокой экспериментальной квалификации.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из шести разделов. В первом разделе представлены характеристики использованных в работе фитопатогенов вирусной и бактериальной природы, титры сывороток, специфичность антител, кинетические константы иммунных взаимодействий. Во втором разделе описаны синтезированные наночастицы и их конъюгаты, изучена агрегативная устойчивость высококонцентрированных смесей конъюгатов наночастиц золота с антителами. В третьем разделе приведены данные по оптимизации иммунохроматографических тест-систем, направленной на достижение минимальных пределов обнаружения аналитов. В четвертом разделе показано использование различных подходов для снижения пределов обнаружения иммунохроматографического анализа вирусных и бактериальных патогенов картофеля. Пятый раздел содержит данные по разработке мультипорогового и мультиплексного иммунохроматографического анализа. Предложена модель,

описывающая процессы формирования иммунных комплексов в мультizonной тест-системе. Шестой раздел посвящен апробации и верификации разработанных тест-систем.

Представленные диссертантом эксперименты корректно спланированы, достоверность полученных результатов подтверждается использованием статистической обработки и альтернативных аналитических методов.

По результатам исследования сформулированы шесть выводов, представленные в заключении диссертационной работы.

Можно выделить следующие основные результаты, определяющие **научную новизну** диссертационной работы В.Г. Панфёрова. Показано влияние состава и геометрии разветвленных иммунных комплексов на их электрофоретическую подвижность. Подтверждена высокая агрегативная устойчивость в гомогенных условиях высококонцентрированных препаратов индивидуальных конъюгатов антител с наночастицами золота и их смесей. Обнаружено влияние частичного блокирования поверхности затравочных золотых наночастиц на морфологию частиц, формирующихся при восстановлении золотохлористоводородной кислоты. Разработаны оригинальные методические подходы для снижения предела обнаружения иммунохроматографического анализа, реализующие различные варианты усиления регистрируемого колориметрического сигнала наночастиц на мембране. Предложена математическая модель, описывающая формирование иммунных комплексов в иммунохроматографической тест-системе с последовательно расположенными тремя зонами связывания. На основании данной модели реализована тест-система, позволяющая проводить визуальную полуколичественную оценку содержания X вируса картофеля во всем диагностически значимом концентрационном диапазоне. Разработан иммунохроматографический анализ, позволяющий в рамках одного тестирования выявлять в пробе до пяти основных фитопатогенов.

Несмотря на общую положительную оценку, по подготовленной работе имеется несколько **вопросов и замечаний**:

1. Специфичность использованных в работе антител в диссертации рассматривается только для антител к X вирусу картофеля (таблица 4). Какие

имеются данные о наличии или отсутствии взаимодействия антител с другими патогенами картофеля?

2. Как были получены данные о концентрации клеток в препаратах бактериальных патогенов, использованных в работе?

3. Как наличие в растительных пробах пигментов и соответствующее неспецифическое окрашивание мембран иммунохроматографической тест-полоски влияют на корректность количественных расчетов содержания определяемых аналитов?

4. Предлагаемый диссертантом способ проведения мультипорогового анализа предполагает наличие нескольких отличающихся по аффинности антител и варьирование их концентраций при нанесении на мембрану. Возможен ли более простой вариант, когда на тест-полоску последовательно друг за другом наносится несколько одинаковых зон связывания, истощающих образовавшийся раствор иммунных комплексов? Если да, то каковы ограничения возможностей такого анализа по сравнению с описанным в диссертационной работе?

5. Сопровождаются ли вирусные инфекции изменением уровня собственных метаболитов картофеля? Возможно ли использование контроля этих соединений для диагностики?

Вышеизложенные замечания не снижают общую положительную оценку диссертации и не влияют на обоснованность ее положений. Диссертационная работа Панфёрова В.Г. прошла достаточную апробацию. Результаты исследований были представлены на тринадцати конференциях. Диссертант является первым автором и соавтором одиннадцати статей в высокоимпактных зарубежных журналах. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание проведенного исследования.

Диссертационная работа Панфёрова Василия Геннадьевича «Изучение взаимодействия антител с вирусными и бактериальными антигенами для создания экспрессных методов определения фитопатогенов», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия», является законченной научно-квалификационной работой и соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых

степеней» (в ред. Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168). Панфёров Василий Геннадьевич заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Лаборатории биосенсоров Института биохимии и физиологии микроорганизмов (ИБФМ РАН) – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук" (протокол № 12 от 7 мая 2019 г.).

Составитель отзыва – заведующий Лабораторией биосенсоров Института биохимии и физиологии микроорганизмов – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», профессор, доктор химических наук Решетиллов Анатолий Николаевич.

Решетиллов А.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Федеральный исследовательский центр "Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук"

Адрес: 142290, Московская обл., г. Пушкино, проспект Науки, д. 3, ФИЦ ПНЦБИ РАН

Телефоны: (495) 632-78-68, (4967) 73-26-36.

Адрес электронной почты: anatol@ibpm.pushchino.ru

