

## ОТЗЫВ

**официального оппонента 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»**

Диссертационная работа В.Г. Панфёрова посвящена изучению взаимодействий фитопатогенов вирусной и бактериальной природы с антителами и их конъюгатами с нанодисперсными маркерами и использованию установленных закономерностей в высокочувствительном иммунохроматографическом анализе (ИХА). Несмотря на широкое применение антител в аналитических системах, достижение с их помощью уровня чувствительности, необходимого для тех или иных практических целей, по-прежнему во многом остается эмпирическим. И если для традиционных аналитических форматов, таких как микропланшетный иммуноферментный анализ, проводимых в близких к равновесным условиям, возможна оценка хода взаимодействий и возможностей реагентов на основании базовых моделей химической кинетики, то для реализации экспрессных систем кинетического иммуноанализа их количественные закономерности оказываются изучены недостаточно. Такая ситуация резко увеличивает трудоемкость разработки крайне востребованных практикой систем для экспрессной внелабораторной диагностики. Замена экстенсивного скрининга препаратов антител и длительного варьирования множества параметров аналитической системы на применение общетеоретических представлений о формировании детектируемых комплексов в ходе ИХА является крайне востребованной и актуальной задачей.

В диссертационной работе В.Г. Панфёрова проведено детальное исследование вышеуказанных проблем на примере крайне сложных аналитов –

вирусных и бактериальных фитопатогенов и установлен ряд важных общих закономерностей. В рамках диссертационной работы впервые:

- проведена характеристика морфологии иммунных комплексов X вируса картофеля с антителами и их моновалентными производными, определены условия формирования разветвленных агрегатов с аномально высокой электрофоретической подвижностью.

- показана агрегативная устойчивость высококонцентрированных ( $A_{520}=80$ ) смесей конъюгатов наночастиц золота с поликлональными антителами. Определены основные стабилизирующие факторы для данных коллоидных растворов.

- разработаны методические решения для снижения предела обнаружения ИХА, основанные на высокоаффинных взаимодействиях конъюгатов магнитных и золотых наночастиц, восстановлении солей серебра и золота на поверхности наночастиц золота, регистрации ферментативной активности конъюгата щелочной фосфатазы с наночастицами золота.

- предложена оригинальная математическая модель, описывающая формирование иммунных комплексов для ИХА с несколькими зонами связывания. На основании данной модели разработан мультипороговый ИХА, позволяющий изменять предел обнаружения в широком диапазоне концентраций.

- разработан мультиплексный формат анализа, основанный на использовании конъюгата наночастиц золота со смесью антител разной специфичности и позволяющий определять до пяти вирусных патогенов картофеля без их дифференцировки.

Диссертационная работа построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения и списка литературы. Работа изложена на 156 страницах, включает 77 рисунков, 16 таблиц и 231 литературный источник.

Литературный обзор основывается на рассмотрении принципа иммунохроматографического анализа в «сэндвич» формате и возможностей этого метода. Особое внимание уделено факторам, определяющим

чувствительность анализа. Автор описывает известные в настоящее время решения, позволяющие снизить предел обнаружения иммунохроматографического анализа. Литературный обзор полностью отражает основные достижения последних лет в области высокочувствительного иммуноанализа.

В главе «Материалы и методы» описаны использованные в работе современные биохимические, аналитические, и иммунохимические методы исследования. Морфология и размер наночастиц всесторонне описаны с использованием методов атомно-силовой, просвечивающей электронной микроскопии, сканирующей электронной микроскопии, динамического лазерного светорассеяния, ассиметричного фракционирования в поле поперечных сил. При характеристике иммунореагентов применены методы регистрации поверхностного плазмонного резонанса, иммуноферментного анализа, иммунохроматографического анализа. Изложение методик проведено достаточно подробно и обеспечивает возможность их воспроизведения, а также доказательного анализа получаемых результатов.

В главе «Результаты и обсуждение» представлены характеристики использованных в работе фитопатогенов и иммунореагентов, синтезированных наночастиц и их конъюгатов, разработка подходов для снижения пределов обнаружения ИХА, мультипорогового и мультиплексных форматов ИХА, а также апробация тест-систем. Эксперименты проведены на высоком научно-методическом уровне, формулируемые заключения по их результатам логично обоснованы и подтверждены соответствующим статистическим инструментарием.

Заключение содержит шесть выводов, которые четко сформулированы и строго отражают результаты, полученные автором диссертационной работы.

В рамках диссертационной работы проведена успешная апробация тест-систем во внелабораторных условиях. Разработанные подходы для снижения предела обнаружения позволяют выявлять растения с латентной инфекцией и тем самым снижать вероятность использования зараженного посевного материала. Отметим, что данные подходы, основанные на высокоаффинных

взаимодействиях, каталитических свойствах маркера и восстановлении солей серебра и золота на поверхности наночастиц, универсальны и могут быть использованы для высокочувствительного иммуноанализа различных антигенов. Поэтому полученные результаты имеют высокую практическую значимость, не ограничивающуюся диагностикой инфекций картофеля.

К диссертационной работе имеется несколько вопросов:

1. Отличаются ли процессы «золотого усиления» – роста наночастиц золота при восстановлении тетрахлораурата – от размеров, формы, площади свободной поверхности исходных наночастиц? Какие наночастицы с учетом этих отличий представляются оптимальными для аналитического применения?

2. Значительная часть представленных в диссертации экспериментов, в том числе получение конъюгатов с золотыми наночастицами, проводилась с использованием общей IgG фракции поликлональных антител. Но доля специфичных к целевому анализу антител в таких препаратах невелика – несколько процентов. Позволит ли дополнительная очистка специфических антител снизить предел обнаружения иммунохроматографического анализа?

3. Согласно рис. 8, для сохранения нативной структуры вируса табачной мозаики с ним следует работать в слабокислой среде. Насколько это требование универсально по отношению к другим вирусам и как оно соблюдалось в работе?

4. Как распределены по органам растения патогены вирусной и бактериальной природы?

Данные вопросы носят дискуссионный характер и не влияют на обоснованность приведенной в диссертации аргументации и на положительную оценку исследования в целом.

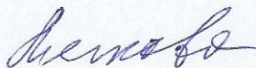
Диссертация В.Г. Панфёрова является законченной научно-квалификационной работой и соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости результатов. В диссертации представлено решение задачи, имеющей важное значение для развития биохимии, – исследовано влияние различных факторов на пределы

обнаружения биоаналитических методов, предложены универсальные подходы для достижения большей чувствительности анализа. Диссертационная работа «Изучение взаимодействия антител с вирусными и бактериальными антигенами для создания экспрессных методов определения фитопатогенов» соответствует критериям, установленным для кандидатских диссертации «Положением о присуждении ученых степеней» (в редакции Постановлений Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, от 2 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024, от 1 октября 2018 г. № 1168), а сам диссертант, Панфёров Василий Геннадьевич, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 «Биохимия».

Мягкова Марина Александровна

доктор биологических наук, код специальности ВАК – 03.00.04 (Биохимия).

Профессор, заведующий лабораторией иммунохимии физиологически активных веществ.



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук

142432 Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, 1, ИФАВ РАН

[m.a.myagkova@gmail.com](mailto:m.a.myagkova@gmail.com)

+7 496 524 95 08

*Подпись заведующей лабораторией иммунохимии физиологически активных веществ М. А. Мягковой заверяю:*

*учен. секретарь  
канд. хим. наук*



*/Т.Н. Великохаткина/*