

ОТЗЫВ

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

Одной из наиболее важных и актуальных задач в области аналитической иммунобиотехнологии является разработка новых простых методов и устройств, позволяющих осуществлять экспресс-анализы сложных смесей биологически активных соединений в объектах окружающей среды и биологических жидкостях. Обязательными требованиями к ним являются простота выполнения анализа, экспрессность, высокая чувствительность, воспроизводимость результатов, стабильность, относительно низкая стоимость, а также дополнительная возможность одновременного количественного определения содержания в анализируемой пробе нескольких веществ в течение реального времени.

Экспресс-тесты такого типа основаны на образовании специфических комплексов определяемых соединений с соответствующими высокоаффинными биомолекулами, в частности, антителами, содержащими так называемые метки, позволяющими визуально или с помощью соответствующих приборов проводить количественную оценку содержания таких комплексов. Активно разрабатываются и реализуются иммунохимические экспресс-методы анализа с использованием в качестве меток антител коллоидных наночастиц металлов, обладающих уникальными физико-химическими и оптическими свойствами вследствие своих нанометровых размеров.

Наиболее широкое использование такие наночастицы в качестве меток получили в аналитических устройствах для проведения так называемого латерального проточного иммуноанализа, в основе которого лежит совмещение принципов проточного твердофазного иммуноанализа и хроматографии на бумаге, в связи с чем метод часто называют иммунохроматографическим. Несмотря на большое количество работ в этой области и новым методическим решениям во многом вопросы выбора наиболее эффективных вариантов и форматов проведения экспресс-анализа, а также

биоспецифических наноразмерных компонентов реакционных тест-систем основаны на чисто эмпирическом подходе и не имеют теоретического обоснования, позволяющего обобщить полученные результаты для создания других систем.

В этой связи бесспорной является актуальность диссертационной работы В.Г. Панфёрова, в которой поставлена цель проведения детальной характеристики взаимодействий, протекающих в мембранных иммунохимических тест-системах латерального проточного иммуноанализа вирусных и бактериальных антигенов картофеля, реализуемых с использованием различных маркеров в различных форматах. В зависимости от типа определяемого соединения, количества имеющихся у него антигенных детерминант, возможности перекрестного взаимодействия антител со структурно близкими соединениями в тестируемых пробах, особенностей перемещения анализируемого объекта по мембране и другим свойствам необходим выбор оптимальных препаратов антител, геометрических характеристик коллоидных частиц и пор мембранных носителей, формата проведения анализа (последовательности формирования детектируемых иммунных комплексов). С учетом этих обстоятельств иммунохроматографическая детекция вирусных частиц представляет несомненный научный интерес, поскольку процесс анализа сопряжен с формированием поливалентных иммунных комплексов между антигеном (с фиксированными на его поверхности повторяющимися детерминантами) и конъюгатом антитело-коллоид (также содержащим ряд сайтов связывания, число и поверхностная плотность которых могут варьироваться в зависимости от практических задач). Данная иммунохимическая реакция ввиду кооперативного мультивалентного характера связывания обеспечивает потенциальную возможность высокочувствительной детекции, однако нуждается в специальном подборе условий проведения взаимодействий на мембранных носителях с тем, чтобы формирование олигомерных агрегатов обеспечивало именно усиление детектируемого сигнала, а не препятствовало движению фронта жидкости и специфической гетерогенной реакции.

Представленная работа основана на сочетании изучения уникальных особенностей вирусных частиц как корпускулярных антигенов с фиксированным расположением на их поверхности повторяющихся антигенных детерминант, так и разработки методов анализа фитопатогенов для решения важной практической задачи их выявления в растительном материале с целью его оздоровления и максимального повышения продуктивности картофеля, с другой стороны. Поскольку эффективный массовый мониторинг пораженности вирусами возможен только при внедрении в практику простых и высокопроизводительных аналитических методик, для решения данной задачи

предлагается создание иммунохроматографических аналитических тест-систем, обеспечивающих высокую специфичность определения наличия и уровня вирусных антигенов в поликомпонентных биопробах, не прибегая к специальным процедурам их предобработки. Из известных на сегодняшний день видов иммуноанализа иммунохроматографический анализ с использованием окрашенных маркеров-носителей представляется оптимальным для широких скрининговых исследований во внелабораторных условиях.

Все вышесказанное позволяет утверждать, что **актуальность, научная и практическая значимость** рецензируемой работы не вызывает никаких сомнений.

Диссертационная работа В.Г. Панфёрова изложена на 156 стр. машинописного текста, построена по традиционной схеме и состоит из введения, литературного обзора (разделы 1.1-1.5), экспериментальной части (разделы 2.1-2.2), результатов и обсуждения (разделы 3.1-3.6), заключения и списка литературы, который включает 231 ссылку, содержит 77 рисунков, 6 таблиц.

Во *Введении* автор обозначает объект исследования, четко формулирует цель работы и задачи, решение которых обеспечивает достижение поставленной цели, научную новизну получаемых результатов, обсуждает практическую значимость работы, используемые методы исследования, обосновывает степень достоверности результатов, а также приводит основные положения научно-квалификационной работы, выносимые на защиту.

Литературный обзор включает рассмотрение двух основных научных аспектов: с одной стороны это анализ современного состояния развития принципов проведения латерального проточного иммуноанализа, а с другой стороны внимание уделено рассмотрению самих объектов исследования - фитопатогенов картофеля вирусной и бактериальной природы и современных методов их диагностики.

В первой части литобзора автор приводит подробное описание строения тест-устройств на основе специальных мембранных носителей, различных форматов проведения иммунохроматографического анализа высокомолекулярных антигенов, основных химических реакций, протекающих в тест-системах, содержащих все необходимые реакционные компоненты. Для современного развития исследований в области иммунохроматографического анализа важной является задача снижения предела обнаружения анализируемых соединений. Это в полной степени относится и к используемым объектам исследования - фитопатогенам картофеля вирусной и бактериальной природы, так как для получения высоких урожаев картофеля необходимо использовать незараженный посевной материал, а, следовательно, к пределам

обнаружения фитопатогенов в анализируемом растительном материале предъявляются жесткие требования. В этой связи большое внимание в литобзоре уделяется анализу факторов, определяющих предел обнаружения в иммунохроматографическом анализе, среди которых важными являются вид маркера и эффективность его детекции, свойства используемых антител. Подробно проанализированы современные способы повышения чувствительности анализа, включающие дополнительные стадии усиления сигнала путем укрупнения размеров наночастиц золота восстановлением солей золота или серебра, использования магнитных частиц или нанозимов в качестве меток наночастиц, а также более сложных по структуре меток, образованных за счет контролируемой агрегации. Отдельный раздел посвящен рассмотрению мультиплексному и мультипороговому вариантам анализа. Выбор в литературном обзоре рассмотренных направлений в анализе обусловлен их дальнейшим развитием и усовершенствованием, проводимым автором в своей диссертационной работе.

Заключительная часть литобзора посвящена характеристике фитопатогенов картофеля вирусной и бактериальной природы и существующим методам диагностики.

В целом литературный обзор содержит большой фактический материал (включает 173 литературные ссылки), который адекватно отражает современное состояние исследований в данной области и позволяет в дальнейшем четко определить новизну и значимость результатов, полученных автором в своей работе.

В разделе *Материалы и методы* соискатель приводит подробное описание использованных реагентов, материалов, оборудования и методов исследования, достаточное для воспроизведения полученных результатов.

Раздел *Результаты и обсуждение* содержит большой экспериментальный материал, полученный с использованием разнообразных и современных инструментальных методов исследования. Прежде всего соискателем проведена подробная характеристика фитопатогенов и иммунореагентов. В работе использованы новейшие инструментальные методы исследования, такие как атомно-силовая микроскопия, динамическое лазерное светорассеяние, поверхностный плазмонный резонанс, асимметричное фракционирование в поле поперечных сил, просвечивающая электронная микроскопия, энергодисперсионная рентгеновская микроскопия, сканирующая электронная микроскопия, иммуноферментный анализ и другие. Подробный анализ полученных экспериментальных данных позволил автору дать исчерпывающую характеристику морфологии фитопатогенов вирусной и бактериальной природы, установить концентрационные диапазоны компонентов иммунокомплекса, обеспечивающих формирование разветвленных агрегатов различного состава,

охарактеризовать специфичность полученных антисывороток, антител и их Fab-фрагментов, определить размер, форму и агрегативную устойчивость наночастиц золота и магнитных наночастиц и их конъюгатов с моноклональными и поликлональными антителами различной специфичности, белком А, комплексами антивидовых антител с щелочной фосфатазой, стрептавидином и другими белками. Знание численных значений полученных кинетических и равновесных констант взаимодействия антител и их фрагментов с соответствующими антигенами сложной структуры позволило автору обдуманно и целенаправленно использовать полученную информацию для создания тест-систем с необходимыми аналитическими характеристиками.

При разработке иммунохроматографического анализа фитопатогенов как вирусной, так и бактериальной природы, для каждого исследованного антигена была проведена оптимизация тест-системы по используемым мембранным компонентам, концентрациям иммобилизованных антител, составу и количеству конъюгатов антител с наночастицами золота и условиям проведения анализа. Полученные пределы обнаружения разработанных систем определения ряда фитопатогенов вирусной и бактериальной природы соответствовали требованиям нормативной документации, однако оказались недостаточными для выявления скрытых инфекций растений или заражений на начальных этапах, в связи с чем была поставлена дальнейшая задача разработать способы для снижения предела обнаружения фитопатогенов. Было предложено и охарактеризовано три оригинальных подхода для снижения предела обнаружения в анализе - магнитном концентрировании гетероагрегатов магнитных частиц с наночастицами золота в тестовой зоне, усилении регистрируемого оптического сигнала наночастиц золота восстановлением на их поверхности солей серебра и золота и использовании двух взаимодействующих друг с другом конъюгатов наночастиц золота со специфическими антителами и с антивидовыми антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой. В результате удалось снизить пределы обнаружения патогенов картофеля до 240 раз по сравнению с существующими методами.

В заключительной части работы автор предлагает два новых подхода для проведения так называемых мультиплексного и мультипорогового вариантов иммунохроматографического анализа для скрининга посевного материала на заражение при проведении большого количества проб в полевых условиях. Путем одновременной адсорбции на наночастицах золота пяти антител различной специфичности удалось разработать формат анализа, выявляющий присутствие в анализируемой пробе любого из возможных пяти вирусов картофеля или их любой комбинации.

Мультипороговый анализ позволяет проводить полуколичественную оценку содержания анализируемого соединения не по интенсивности окрашивания тестовой линии, а путем подсчета числа видимых полос в аналитической зоне тест-устройства. Следует отметить, что такой подход может быть полезен для предварительной оценки уровня содержания того или иного антигена в анализируемом образце.

В заключение следует отметить достоверность, обоснованность и оригинальность представленных в исследовании результатов. На основании характеристик взаимодействий, полученных с использованием высокоинформативных новейших инструментальных методов исследований автором созданы аналитические системы, позволяющие проводить экспресс-анализы посевного материала картофеля, имеющие важную практическую значимость. Используемые методы полностью соответствуют характеру поставленных задач. Несомненным достоинством работы является то, что в процессе разработки конкретных систем анализа на всех этапах использована количественная цифровая обработка результатов анализа, что полностью исключает субъективный подход к интерпретации результатов и дает возможность осуществлять статистическую обработку данных, получаемых с необходимым количеством повторов.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания.

1. При изучении кинетики взаимодействия антигена ХВК с антителами проводились исследования методом поверхностного плазмонного резонанса. Ковалентную иммобилизацию антител на чипе с карбоксильными группами проводили реакцией с использованием водорастворимого карбодимида в присутствии N-оксисукцинимиды, т.е. проходит взаимодействие антител с незаряженными активированными карбоксильными группами. Не вполне понятна в таком случае интерпретация процесса связывания антител, обусловленная максимальным электростатическим притяжением молекул антител и поверхности чипа (стр. 59).

2. В эксперименте на рис.14 кривая в точке 2 соответствует связыванию свободных антител с комплексом ХВК-антитела на чипе. Отмечается, что дальнейшая "Зона падения сигнала соответствует диссоциации иммунных комплексов ХВК-свободные антитела". Почему в данном случае не наблюдается (или не обсуждается) диссоциация тройного комплекса по связям ХВК с ковалентно иммобилизованными на чипе антителами?

3. В таблице 6 приведены кинетические константы скоростей образования и диссоциации иммунных комплексов моноклональных и поликлональных антител и Fab-фрагментов с ХВК. Для поликлональных антител, представляющих смесь различных антител с различными индивидуальными константами, полученная величина является кажущейся, что должно было быть отмечено в подписи.

4. Почему при одновременной иммобилизации пяти разных антител была выбрана такая большая общая концентрация антител - 50 мкг/мл (у каждого оптимум концентрации для сорбции 10 мкг/мл). В таких условиях не исключена многослойная иммобилизация, так как антитела сорбируются на наночастицах золота не независимо друг от друга. Может быть надо было снизить каждую концентрацию в 5 раз, чтобы общая концентрация была оптимальной?

5. На рис.33 представлены зависимости интенсивности регистрируемых сигналов в тестовых зонах от количества конъюгата с антителами. Выбрано оптимальное значение по получаемой интенсивности сигнала с оптической плотностью $A_{520}=5$. При этом неясно, как увеличение концентрации конъюгата на мембране влияет на фон (сигнал увеличивается, а как при этом меняется соотношение сигнал/фон?)

6. В разрабатываемом мультипороговом варианте анализа показано, что предел обнаружения зависит от концентраций иммобилизованных антител и их аффинности. В таблице 14 приведены данные по пределу обнаружения для различных вариантов анализов X вирусов картофеля с использованием разных образцов антител с различными аффинностями и вариантами анализа. Не вполне понятен основной критерий формирования полос в аналитической зоне устройства для создания мультипорогового формата (это - аффинность, концентрация антител на мембране, величина константы скорости прямой реакции образования иммунного комплекса?). В разделе, теоретически описывающем процессы, протекающие в реакционных зонах, можно было дать более точное описание модели с учетом уравнений материального баланса компонентов, участвующих в реакции, соотношения начальных концентраций компонентов, численных диапазонов кинетических констант и аффинности, а также предположений о режиме протекания реакций – равновесном или кинетическом. В представленном виде модель является весьма приближенной и основана на простом словесном описании происходящих процессов.

Однако все вышеизложенные соображения имеют частный и рекомендательный характер и не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту диссертации, и не снижают ее общую очень высокую оценку.

Результаты проведенных исследований представлены научному сообществу на тринадцати научных мероприятиях всероссийского и международного уровня. Основные положения и выводы работы представлены в 24 публикациях, в том числе в одиннадцати статьях в журналах, индексируемых в базах данных «Web of Science» и «Scopus» с высокими импакт-факторами. Содержание работы в полной мере соответствует специальности 03.01.04 – «Биохимия». Содержание автореферата полностью

соответствует основным положениям и выводам диссертационной работы и адекватно отражает результаты выполненного исследования.

В.Г. Панфёровым выполнена научно-квалификационная работа, в которой, в соответствии с требованиями п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемыми к кандидатским диссертациям, содержится решение задачи, имеющей существенное значение для понимания процессов иммунохимических взаимодействий широкого спектра антител с вирусными и бактериальными фитопатогенами, которые положены в основу разработки эффективных тест-систем для экспресс—определения зараженности картофеля.

Диссертация В.Г. Панфёрова «Изучение взаимодействия антител с вирусными и бактериальными антигенами для создания экспрессных методов определения фитопатогенов» по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов является законченной работой высокого теоретического и экспериментального уровня. Диссертационная работа В.Г. Панфёрова полностью соответствует требованиям, устанавливаемым «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24.09 2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04 2016 г. № 335), а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

Осипов Александр Павлович

кандидат химических наук, код специальности ВАК - 02.00.15 (Кинетика и катализ), старший научный сотрудник.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», кафедра функциональных наносистем и высокотемпературных материалов, институт новых материалов и технологий

aposipov@mail.ru

+7 495 939 34 07

ПОДПИСАНО
Проректор по развитию
и общим вопросам
НИТУ



ЗАВЕРЯЮ
И.М. Исаев