

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

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 6 июня 2019 г. №19 о присуждении
Панфёрову Василию Геннадьевичу, гражданство Российская Федерация,
ученой степени кандидата химических наук

Диссертация «Изучение взаимодействия антител с вирусными и бактериальными антигенами для создания экспрессных методов определения фитопатогенов», по специальности 03.01.04 Биохимия, принята к защите 04.04.2019 г., протокол № 12, диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет утвержден Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г., с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13 февраля 2013 года № 74/нк, от 10 февраля 2014 года № 55/нк и от 30.09.2015 №1166/нк и 13 марта 2019 года № 222/нк.

Соискатель

Панфёров Василий Геннадьевич (1992 года рождения) в 2014 г. окончил кафедру биотехнологии и технологии продуктов биоорганического синтеза ФГБОУ высшего профессионального образования «Московский Государственный Университет Пищевых Производств» по специальности

260401.65 «Технология жиров, эфирных масел и парфюмерно-косметических продуктов». С 2014 по 2018 г. обучался в аспирантуре Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук (в 2015 г. реорганизован в Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)) в рамках учебной очной программы 03.01.04 «Биохимия». В 2018 г. на базе ФИЦ Биотехнологии РАН Панфёров В.Г. защитил научно-исследовательскую работу «Изучение взаимодействия антител с вирусными и бактериальными антигенами для создания экспрессных методов определения фитопатогенов» с присвоением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь». В 2015 г. Панфёров В.Г. стал победителем программы «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» (У.М.Н.И.К.). В 2018 г. стал лауреатом стипендии им. В.Л. Кретовича.

Научные руководители

Дзантиев Борис Борисович, доктор химических наук, профессор, руководитель отдела лиганд-рецепторных взаимодействий и биосенсорики ФИЦ Биотехнологии РАН.

Сафенкова Ирина Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела лиганд-рецепторных взаимодействий и биосенсорики ФИЦ Биотехнологии РАН.

Официальные оппоненты

Мягкова Марина Александровна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, заведующий лабораторией иммунохимии физиологически активных веществ.

Осипов Александр Павлович, кандидат химических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»,

кафедра функциональных наносистем и высокотемпературных материалов, институт новых материалов и технологий, доцент.

Выбор официальных оппонентов был обусловлен тем, что:

доктор биологических наук Мягкова Марина Александровна является специалистом в области иммунохимии, изучения иммунохимических взаимодействий и использования данных взаимодействий для разработки иммуноаналитических тест-систем.

кандидат химических наук Осипов Александр Павлович является крупным специалистом в области иммуноанализа и биокинетики, в частности, иммунохимических взаимодействий в биоаналитических системах.

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Панфёрова Василия Геннадьевича.

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Федеральный исследовательский центр "Пушкинский научный центр биологических исследований" Российской академии наук" (ФИЦ ПНБИ РАН). Составитель отзыва – заведующий лабораторией биосенсоров Института биохимии и физиологии микроорганизмов – обособленного подразделения ФИЦ ПНБИ РАН, профессор, доктор химических наук Решетилов Анатолий Николаевич.

Выбор ведущей организации обусловлен тем, что ФИЦ ПНБИ РАН является признанным отечественным центром в проведении фундаментальных и прикладных исследований в области лиганд-рецепторных взаимодействий и иммуноанализа, непосредственно связанных с тематикой диссертационной работы Панфёрова В.Г.

Высокая квалификация официальных оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы Панфёрова Василия Геннадьевича.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы Панфёрова В.Г. изложены в 11 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям «Положения 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).

Список статей:

1. **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Drenova N.V., Kornev K.P., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of the sensitive lateral flow immunoassay with silver enhancement for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers. *Talanta*, 2016, v. 152, pp. 521–530. (IF = 4,244).
2. Beloborodov S.S., **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Krylova S.M., Dzantiev B.B., Krylov S.N. Unexpected electrophoretic behavior of complexes between rod-like virions and bivalent antibodies. *Analytical Chemistry*, 2016, v. 88, N 26, pp. 11908–11912. (IF = 6,042).
3. Safenkova I.V., Slutskaia E.S., **Panferov V.G.**, Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Complex analysis of concentrated antibody-gold nanoparticle conjugates' mixtures using asymmetric flow field-flow fractionation. *Journal of Chromatography A*, 2016, v. 1477, pp. 56–63. (IF = 3,716).
4. **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Setting up the cut-off level of a sensitive barcode lateral flow assay with magnetic nanoparticles. *Talanta*, 2017, v. 164, pp. 69–76. (IF = 4,244).
5. **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Enhancement of lateral flow immunoassay by alkaline phosphatase: a simple and highly sensitive test for potato virus X. *Microchimica Acta*, 2018, v. 185, art. 25. (IF = 5,705).
6. Razo S.C., **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Double-enhanced lateral flow immunoassay for potato virus X based on a combination of magnetic and gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 2018, v. 1007, pp. 50–60. (IF = 5,123)
7. **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Byzova N.A., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Silver-enhanced lateral flow immunoassay for highly-sensitive detection of potato leafroll virus. *Food and Agricultural Immunology*, 2018, v. 29, N 1, pp. 445–457. (IF = 2,568).
8. **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Post-assay growth of gold nanoparticles as a tool for highly sensitive lateral flow immunoassay. Application to the detection of potato virus X. *Microchimica Acta*, 2018, v. 185, art. 506. (IF = 5,705).
9. Razo S.C., **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Pakina E.N., Dzantiev B.B. How to improve sensitivity of sandwich lateral

flow immunoassay for corpuscular antigens on the example of potato virus Y? *Sensors*, 2018, v. 18, art. 3975. (IF = 2,475).

10. Razo S.C., Panferova N.A., **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Drenova N.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Pakina E.N., Dzantiev B.B. Enlargement of gold nanoparticles for sensitive immunochromatographic diagnostics of potato brown rot. *Sensors*, 2019, v. 19, art. 153. (IF = 2,475).

11. Safenkova I.V., **Panferov V.G.**, Panferova N.A., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Alarm lateral flow immunoassay for detection of the total infection caused by the five viruses. *Talanta*, 2019, v. 195, pp. 739–744. (IF = 4,244).

Результаты работы также опубликованы в материалах 13 научных конференций.

1. **Панфёров В.Г.**, Сафенкова И.В., Варицев Ю.А., Дренова Н.В., Корнев К.П., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Разработка иммунохроматографической тест-системы с усилением серебром для определения *Ralstonia solanacearum* в клубнях картофеля. Сборник материалов XXVIII зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 8-11 февраля 2016 г., Москва. С. 146.

2. **Панфёров В.Г.**, Сафенкова И.В., Варицев Ю.А., Дренова Н.В., Корнев К.П., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Высококчувствительная диагностика бурой гнили картофеля методом иммунохроматографии. Тезисы докладов Международной научно-практической конференции «Биотехнология в комплексном развитии регионов». 15-17 марта 2016 г., Москва. С. 25.

3. Сафенкова И.В., **Панфёров В.Г.**, Бызова Н.А., Варицев Ю.А., Зайцев И.А., Галушка П.А., Варицева Г.П., Усков А.Т., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Экспрессный иммунохимический мультианализ вирусных и бактериальных патогенов картофеля. Тезисы докладов Международной научно-практической конференции «Биотехнология в комплексном развитии регионов». 15-17 марта 2016 г., Москва. С. 27.

4. Safenkova I.S., Slutskaya E.S., **Panferov V.G.**, Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Asymmetric flow field-flow fractionation for characterization of highly concentrated conjugates of gold nanoparticles and antibodies. Book of Abstracts of the 18th International Symposium on Flow- and Field Based Separations (FFF2016). May 22-26, 2016. Dresden, Germany. Th. P4.

5. **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Efficient formats of lateral flow immunoassay: The use of magnetic nanoparticles and controllable cut-off-levels. Point-of-Care Diagnostics, May 10-11, 2017. Munich, Germany. Abstracts of the Conference. P. 100.

6. **Панфёров В.Г.** Количественная характеристика единичных взаимодействий вирус-антитело и разработка иммунохимических мультиплексных систем детекции вирусных и бактериальных фитопатогенов. Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов: 19-25 июня 2017 г.:

Направление подготовки 06.06.01 «Биологические науки». М.: МАКС Пресс, 2017. С. 42–45.

7. Razo S.C., **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Double enhancement based lateral flow immunoassay for potato virus X detection. Biocatalysis-2017: Abstracts of 11th International Conference "Biocatalysis: Fundamentals and Applications". June 25-30, 2017, Moscow region, Russian Federation. Moscow: Innovations and High Technologies MSU Ltd., 2017. P. 190-191.

8. **Панферов В.Г.**, Сафенкова И.В., Разо Ш., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Применение магнитных частиц для иммунохроматографического анализа X вируса картофеля. Тезисы докладов Третьего съезда аналитиков России. 8-13 октября 2017 г., Москва. М.: ГЕОХИ РАН. 2017. Рег. № 533. С. 124.

9. Safenkova I.V., **Panferov V.G.**, Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Enhancing nanoparticle-based approaches for ultrasensitive immunoassays. Program and Abstract Book of the 9th International Conference "Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues" including Russian-Hellenic workshop and school of young scientists. May 6-13, 2018. Heraklion, Crete, Greece. P. 28.

10. Сафенкова И.В., **Панфёров В.Г.**, Немченко Н.А., Варицев Ю.А., Зайцев И.А., Варицева Г.П., Галушка П.А., Усков А.И., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографическая тест-система для одновременного контроля десяти патогенов картофеля. Сборник трудов конференции «Современное состояние и перспективы развития селекции и семеноводства картофеля». 09-10 июля 2018, Московская область. С. 232-245.

11. **Панфёров В.Г.**, Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Разработка высокочувствительных методов иммунохроматографического анализа фитопатогенов вирусной и бактериальной природы. Актуальная биотехнология. № 3 (26). Материалы VI международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». Ялта, 16-20 сентября 2018 г. С. 555.

12. Бызова Н.А., Сафенкова И.В., **Панфёров В.Г.**, Урусов А.Е., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Разработка и апробация иммунохроматографических тест-систем для экспрессного контроля фитопатогенов. Международная научно-практическая конференция «Современные технологии и средства защиты растений – платформа для инновационного освоения в АПК России». Сборник материалов. Санкт-Петербург – Пушкин, 8-12 октября 2018 г. С. 29–31.

13. **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Approaches to decrease the detection limit of lateral flow immunoassay. Book of Abstracts of the 12th Conference in the Rapid Methods Europe (RME2018). 5-7 November, 2018, Amsterdam, the Netherlands. P. 84.

На диссертацию и автореферат поступили следующие отзывы:

Отзыв ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований" Российской академии наук". Отзыв положительный. Отзыв содержит следующие замечания:

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?

На автореферат поступило **четырнадцать отзывов.**

Буркин Максим Алексеевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биоконъюгатов, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова». Отзыв положительный. Отзыв содержит следующие замечания:

1. Не лишним было бы конкретизировать в названии «фитопатогенов картофеля».

2. Вызывает сомнение формулировка, что высокая электрофоретическая подвижность обусловлена разветвленностью комплексов. Сопротивление разветвленных молекул или комплексов, напротив, препятствует подвижности. Вероятно, высокую электрофоретическую подвижность разветвлённого комплекса обусловил его значительный заряд.

3. Не указаны источник, молекулярная специфичность и изотип моноклональных антител.

4. Заявленный в качестве фитопатогена вирус картофеля А (АВК) не упоминается в работе.

5. Мольное соотношение в комплексах вирус-антитело 1:200 и 1:500. Как определялась «молекулярная масса» вируса? С чем связан феномен образования агрегатов при избытке антител? В аналогичных ситуациях увеличение избытка бивалентных антител обычно препятствует образованию преципитата, агглютината и т.д.

Комкова Мария Андреевна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник кафедры аналитической химии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Отзыв положительный, содержит замечания:

1. На рисунке 12 интенсивности сигналов на тест-полосках после ИХА различных концентраций (например, 333 и 111, 37 и 12.3 нг/мл) ХВК в экстракте листьев картофеля неразличимы. Пригодны ли такие системы для количественного анализа?

2. Время амплификации сигнала в рамках реализации концентрирования окрашенных наночастиц в тестовой зоне магнитным полем составило 30 минут. Можно ли считать такой метод экспрессным?

Попов Константин Иванович, доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник АО НЦ «Малотоннажная химия». Отзыв положительный. Отзыв содержит следующие замечания:

1. В качестве замечания к разделу «АПРОБАЦИЯ» можно отметить, что по данным РИНЦ и SciFibder статьи диссертанта за очень короткий срок были семикратно процитированы независимыми группами исследователей. Эти сведения, несомненно, являются апробацией, и должны были быть размещены в соответствующем разделе реферата.

2. Число значащих цифр у некоторых показателей Таблицы 1 не должно превышать погрешности измерения (вместо 9.8 ± 1.5 следует писать 10 ± 2), а в Таблице 2 желательно было привести погрешности для пределов обнаружения.

Медянцева Эльвина Павловна, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова. Отзыв положительный. Отзыв содержит замечания:

1. Наличие растительных пигментов в исследуемых образцах зараженных и здоровых растений как-то сказывается на интенсивности окрашивания иммунохроматографических тест-полосок? Этот аспект как-то учитывался при соответствующих разработках?

2. В автореферате в табл.1 (стр. 6) не всегда соблюдены правила округления полученных констант ассоциации и диссоциации.

Ермолаева Татьяна Николаевна, доктор химических наук, профессор, профессор кафедры химии, ФГБОУ ВО Липецкий государственный технический университет. Отзыв положительный, содержит замечание:

1. Поскольку в автореферате делается акцент на снижение пределов обнаружения патогенов картофеля, то, вероятно, разработаны методики скрининга, выявляющие отсутствие или присутствие патогенов картофеля на определенном уровне, а не методики определения фитопатогенов.

Шеховцова Татьяна Николаевна, доктор химических наук, профессор, профессор кафедры аналитической химии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Отзыв положительный, содержит замечания:

1. Не слишком удачным представляется название диссертационной работы. «Изучение...» - это процесс, а в работе должен быть представлен (и так и есть на самом деле) результат этого изучения, заключающийся в создании метода. То есть лучше было бы, на мой взгляд, «перевернуть» название.

2. Выводы работы представлены в слишком общем виде, практически отсутствуют конкретные сведения по каждому из их положений. Не сделан вывод о том, какой из предложенных подходов позволяет добиться лучших по всем параметрам результатов (табл.2). Фактически отсутствует вывод о практическом применении разработанных систем, не упомянута достигнутая экспрессность анализа. Такая хорошая работа, несомненно, заслуживает гораздо более весомых, солидных и конкретных выводов.

3. Нельзя считать бесспорным термин «мультипороговый» анализ. Без внимательного прочтения соответствующих разделов работы смысл его совершенно непонятен.

Дрыгин Юрий Фёдорович, доктор химических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии вирусов НИИ Физико-химической

биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Отзыв положительный, содержит замечания:

1. В постановке диагноза необходима достоверная воспроизводимость результатов диагностики. К сожалению, в реферате не уделено должного внимания статистической обработке результатов.
2. Не указано происхождение используемых антител.
3. Непонятно что такое компоненты растительных матриц, не мешающих анализу. Если имеется в виду внеклеточный матрикс, то здесь не менее важен эффект и клеточного содержимого.
4. Почему на рис. 6а магнитная частица имеет вдвое меньший диаметр, чем на рис. 6б и 6в?

Усков Александр Иринархович, доктор сельскохозяйственных наук, заведующий отделом биотехнологии и иммунодиагностики, главный научный сотрудник ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха. Отзыв положительный, не содержит замечаний.

Хлебцов Николай Григорьевич, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий лабораторией нанобиотехнологии ФГБУН Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук. Отзыв положительный, не содержит замечаний.

Ярков Сергей Петрович, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, начальник отдела спектральных методов анализа ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения». Отзыв положительный, не содержит замечаний.

Горячева Ирина Юрьевна, доктор химических наук, профессор, Саратовский национальный исследовательский университет им. Н.Г. Чернышевского. Отзыв положительный, не содержит замечаний.

Сахаров Иван Юрьевич, доктор химических наук, профессор, кафедра химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Отзыв положительный, не содержит замечаний.

Кузнецова Мария Алексеевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая отделом болезней картофеля и овощных культур ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии. **Стацюк Наталия Владимировна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии. Отзыв положительный, не содержит замечаний.

Приходько Юрий Николаевич, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ Всероссийский центр карантина растений. **Дренова Наталия Васильевна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, начальник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ Всероссийский центр карантина растений. Отзыв положительный, не содержит замечаний.

Отзывы официальных оппонентов.

Мягкова Марина Александровна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук,

заведующий лабораторией иммунохимии физиологически активных веществ. Отзыв положительный. Отзыв содержит следующие замечания:

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 аналиту 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?

Осипов Александр Павлович, кандидат химических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», кафедра функциональных наносистем и высокотемпературных материалов, институт новых материалов и технологий, доцент. Отзыв положительный. Отзыв содержит следующие 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 (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.

В дискуссии принимали участие: д.х.н. Еремин С.А., д.б.н. Юрина Н.П., д.б.н. Капрельянц А.С., д.б.н. Шумянцева В.В. С отзывами на диссертацию выступили д.х.н. Еремин С.А., д.б.н. Юрина Н.П., д.х.н. Дрыгин Ю.Ф (НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова).

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

- Условия формирования разветвленных иммунных комплексов поливалентных вирионов с моноклональными антителами.
- Агрегативная устойчивость и функциональная активность высококонцентрированной смеси конъюгатов наночастиц золота с антителами в гомогенных условиях.

- Влияние частичного блокирования поверхности наночастиц золота на восстановление солей золота и морфологию формирующихся частиц в коллоидном растворе и на мембране.

- Методические подходы для снижения пределов обнаружения иммунохроматографического анализа.

- Контролируемое изменение количества иммунных комплексов в проточной мультипороговой системе, основанное на варьировании кинетических параметров иммунных взаимодействий.

- Мультипороговый и мультиплексные форматы иммунохроматографического анализа вирусных и бактериальных фитопатогенов.

Теоретическая значимость исследования

- Показано влияние структуры иммунных комплексов антител с поливалентными антигенами на электрофоретическую подвижность агрегатов. Определены условия формирования разветвленных иммунных комплексов.

- Установлены основные факторы, определяющие стабильность высококонцентрированных коллоидных растворов конъюгатов наночастиц золота с антителами.

- Определено влияние блокирования поверхности наночастиц золота на восстановление тетрахлораурата и формирования наращенных наночастиц в гомогенных и гетерогенных условиях.

- На основании высокоаффинных биорецепторных взаимодействий предложены оригинальные подходы для снижения предела обнаружения иммунохроматографического анализа.

Практическая значимость исследования

- Разработанные тест-системы могут быть использованы для внелабораторного скрининга фитопатогенов вирусной и бактериальной природы.

- Предложенные подходы для снижения предела обнаружения анализа являются универсальными и могут быть использованы для высокочувствительного определения широкого круга аналитов.
- Мультиплексный и мультипороговые форматы анализа существенно увеличивают производительность и информативность исследований во внелабораторных условиях.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

Полученные результаты интерпретировали с использованием статистически обработанных данных, подтвержденных альтернативными аналитическими методами, исключающими субъективность заключений. Таким образом, полученные Панфёров В.Г. результаты являются достоверными.

Личный вклад соискателя состоит:

в получении и характеристики поликлональных антител, наночастиц и их конъюгатов с рецепторными молекулами. Экспериментальные данные получены либо автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Заключение

Диссертация Панфёрова Василия Геннадьевича является законченной научно-квалификационной работой. Работа выполнена на высоком методическом уровне и содержит решение научной задачи, имеющей важное значение для развития биохимии.

На заседании 6 июня 2019 года диссертационный совет принял решение присудить Панфёрову Василию Геннадьевичу ученую степень кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 11 докторов биологических наук, 6 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав Совета Д 002.247.01, проголосовал:

«За» присуждение ученой степени - 18

«Против» присуждения ученой степени - 0

Недействительных бюллетеней - 0

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

06 июня 2019 г.

