

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Жердева Анатолия Виталиевича «Иммунохроматографические системы: молекулярные закономерности функционирования и практические приложения», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук в виде научного доклада по специальности 1.5.4. Биохимия

Около 20 лет назад несколько компаний начали производить иммунохроматографические тест-системы для безинструментальной портативной диагностики. Благодаря своей высокой специфичности и чувствительности эти стрип-тесты нашли широкое применение при обнаружении наркотиков и токсинов, а также при скрининге особо опасных инфекций и урогенитальных заболеваний. Затем были разработаны методы детекции бактериальных и вирусных инфекций человека, животных и растений. Экспресс-тесты применяют для ранней диагностики беременности, а также для обнаружения пестицидов, гормонов, антибиотиков и других лекарственных средств. Иммунохроматографический анализ основан на движении элюента вдоль мембраны (латеральная диффузия), приводящем к образованию специфических иммунных комплексов, которые визуализируются в виде цветных полос. В качестве меток в этих системах используются ферменты, флуорохромы, окрашенные латексы, но чаще всего наночастицы золота. Исследования показали, что такие системы анализа очень стабильны, их результаты воспроизводимы, и они коррелируют с альтернативными методами. Эти анализы очень просты и удобны в использовании.

Таким образом, экспресс-тесты, являясь эффективными диагностическими средствами, позволяют за считанные минуты качественно и количественно определять антигены, антитела, гормоны и другие диагностически важные вещества у людей и животных. Важным преимуществом этих тестов является их использование в диагностике *in vitro*, не требующей присутствия пациента. Однако иммунохроматографические тест-полоски не лишены слабых мест, связанных с надежностью, чувствительностью и экономичностью. Надежность и чувствительность зависят, во-первых, от качества используемых в тесте антител и, во-вторых, от концентрации антигена в биоматериале, а также от закономерностей взаимодействия антиген-антитело и эффективности используемых меток при проведении иммунохроматографии. Кроме того, вопрос об универсальности предлагаемых решений для широкого спектра аналитических приложений остается открытым. В связи

с этим крайне востребованы общие описания процессов образования иммунных комплексов в проточных мембранных системах, которые пригодны для разных антигенов, различных методических особенностей анализа и разработки новых аналитических систем.

Именно решению многих из этих нетривиальных задач и посвящено диссертационное исследование А.В. Жердева, что и определяет, на наш взгляд, его актуальность, научную новизну и практическую значимость.

Теперь позвольте перейти к содержательной части работы. Диссертация в виде научного доклада изложена на 112 страницах, иллюстрирована 43 рисунками, включает 9 таблиц. Список использованных литературных источников содержит 112 наименований. Диссертация состоит из введения и семи глав основного содержания. Далее следуют заключение (выводы), библиография и списки научных публикаций и патентов автора.

Во введении автор обосновывает актуальность выбранной темы и степень разработанности проблемы, формулирует цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, характеризует научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы.

Главы основного содержания построены по следующему принципу: сначала приводится общая характеристика (краткий литературный обзор) исследований по направлению, которому посвящена глава, затем следует сжатое изложение проведенных исследований, завершается глава общей оценкой полученных результатов. Несмотря на краткость, литературный обзор в достаточной степени вводит читателя в контекст исследований в этой области и подводит к направлению, выбранному диссертантом. В целом, диссертация написана хорошим литературным научным языком, грамотно (практически без ошибок и опечаток), ясно и логично, прекрасно проиллюстрирована.

Глава 1 посвящена измерению количественных характеристик иммунохимических взаимодействий. Автором сравнены способы измерения параметров иммунных взаимодействий, охарактеризованы их возможности применительно к различным типам антигенов. Предложены усовершенствованные методики, повышающие достоверность получаемых результатов. Проведена оценка вклада бивалентного связывания антител с поливалентными антигенами в характеристики иммунохимической реакции. Измерены равновесные и кинетические параметры для взаимодействий сочетаний антигенов разных классов с антителами и

комплексами антитело-наночастица, обеспечивающие возможность численной характеристики моделей иммуноаналитических систем.

Вторая глава знакомит нас с классификацией и математическим моделированием иммунохроматографических систем, предложенных автором. Диссертант разработал иерархическую классификацию форматов гетерогенного иммуноанализа, основанную на общих признаках состава и порядка формирования иммунных комплексов. Показана ее адекватность применительно к иммунохроматографии и прогностическая эффективность при поиске решений по изменению аналитических характеристик. Кроме того, был разработан комплекс математических моделей, описывающих межмолекулярные взаимодействия и образование детектируемых комплексов в форматах иммунохроматографии. На основании изучения этих моделей установлены факторы, лимитирующие аналитические характеристики тест-систем. Сформулированы и экспериментально подтверждены рекомендации по снижению пределов обнаружения и повышению диагностической достоверности иммунохроматографии.

Глава 3 предоставляет сведения о свойствах ультрадисперсных носителей и их функционировании в иммунохроматографических системах. В результате проведенных исследований были разработаны методы для характеристики состава и функциональной активности конъюгатов наночастиц золота с антителами и выявления наиболее эффективных аналитических реагентов. Предложена система критериев для быстрой оценки возможностей применения ультрадисперсных частиц для иммунохроматографических систем. С учетом данных критериев проведена характеристика ряда новых препаратов наночастиц-маркёров, экспериментально подтверждены их преимущества в реализованных иммунохроматографических тест-системах. В частности, изучены возможности магнитных частиц как реагентов, эффективно объединяющих использование гомогенных и гетерогенных взаимодействий при проведении иммунохроматографии и обеспечивающих тем самым сочетание экспрессности тестирования и низких пределов обнаружения аналитов.

4 глава информирует читателей о проведенных автором исследованиях, посвященных селективности иммуноопределения по отношению к структурно близких соединениям. На основании теоретического и экспериментального изучения показано, что модуляция селективности может быть осуществлена даже для одних и тех же иммунореагентов посредством изменения используемых количеств и соотношений. Рассмотрены возможности управления селективностью при выборе структуры гаптенa в составе иммуногена и антигенного препарата, конкурирующего при проведении иммуноанализа. Предложены способы модификации аналита при пробоподготовке и

проведении иммуноанализа, влияющие на эффективность и селективность его иммунохимического обнаружения. Рассмотрено применение QSAR-анализа (поиск количественных соотношений структура-свойство) для выявления основных структурных элементов химически близких соединений, определяющих эффективность их связывания с антителами.

Глава 5 сообщает данные об авторской разработке мультиплексных иммунохроматографических систем. Были предложены оригинальные способы одновременной эффективной иммунохроматографии большого числа аналитов на основе изучения кинетических особенностей взаимодействий иммунореагентов, обусловленных разной локализацией зон связывания.

Шестая глава дает представления о способах понижения пределов обнаружения аналита в иммунохроматографических системах. Автором предложен ряд подходов, обеспечивающих минимизацию пределов обнаружения в иммунохроматографии или соответствие пороговых уровней тест-систем наиболее информативной дифференциации положительных и отрицательных проб.

В заключительной главе диссертант приводит результаты исследований по разработке, характеристики и апробации тест-систем для обнаружения антигенов разных классов при решении ряда задач медицинской и агротехнической диагностики, контроля качества и безопасности потребительской продукции, оценки загрязненности окружающей среды. Во впечатляющей таблице 9 приведены данные о более чем 60 разработанных автором иммунохроматографических системах. Поражает разнообразие анализируемых веществ – низко- и высокомолекулярных и корпускулярных антигенов. Список включает в себя пестициды, токсины, лекарственные средства различной природы, биомаркёры, бактериальные и вирусные патогены и др.

Оценивая главы основного содержания в целом, можно констатировать, что автором предложен целый ряд оригинальных подходов к исследованиям молекулярных закономерностей функционирования и практическим приложениям иммунохроматографических систем. Следует с уважением отметить, что А.В. Жердевым осуществлен очень большой объем экспериментальной работы, проведенной самыми современными адекватными методами, вследствие чего были получены весьма интересные новые результаты, обладающие как фундаментальным, так и прикладным значением.

Раздел «Заключение» подводит итоги выполненного исследования, представляет семь расширенных выводов, обоснованно резюмирующих основные результаты

диссертационной работы, и предлагает рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

У меня нет принципиальных замечаний к содержанию диссертации. Однако, исходя из большого опыта автора в создании иммунохроматографических систем, хотелось бы получить ответы на вопросы: (1) какая из используемых меток все же предпочтительнее при создании тест-полосок и (2) какие размер и форма наночастиц золота приводят к лучшему результату анализа исходя из критериев чувствительности и специфичности.

Переходя к итоговой оценке, отмечу, что, на мой взгляд, диссертация Анатолия Виталиевича Жердева – пример замечательной работы, которая могла возникнуть только при тесном контакте исследователей и взаимовлиянии фундаментальных знаний, представляющих различные области науки – биохимию, аналитическую химию, иммунологию, медицину – с одной стороны и оптику, коллоидную химию, нанобиотехнологию – с другой. Немаловажно, что материалы диссертации апробированы на многочисленных конференциях и симпозиумах. Впечатляет публикационная активность автора: основные результаты исследования отражены в 118 статьях в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ (из них 82 статьи в журналах, относящихся к первому или второму квартилям международных баз данных). О важной практической значимости работы диссертанта свидетельствуют 15 патентов РФ на изобретения. Исследования были поддержаны 4 грантами РФФИ и 3 грантами РНФ, руководителем которых являлся автор.

Таким образом, можно констатировать, что диссертационная работа Анатолия Виталиевича Жердева, успешно сочетающая как фундаментальное, так и прикладное направление, является первоклассным исследованием, выполненным на весьма высоком современном методическом уровне. Полученные экспериментальные данные интерпретированы на основе тщательного осмысления литературного материала и представляют безусловный интерес для широкого круга исследователей и практиков в области биохимии, иммунохимии, нанобиотехнологии и биомедицины. Не вызывают сомнения ни научно-теоретическая, ни методическая значимость работы.

Оценивая диссертационную работу Анатолия Виталиевича Жердева в целом, следует заключить, что на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения в области молекулярных закономерностей функционирования иммунохроматографических систем, совокупность которых, наряду с их практическим применением, можно квалифицировать как крупное научное достижение. Хочется подчеркнуть, что все результаты, изложенные в диссертации,

получены Анатолием Виталиевичем Жердевым лично или при его самом активном участии, но более важен тот факт, что цельность исследования и его значимость для науки – безусловная заслуга диссертанта. Думается, что расширенный вариант диссертации заслуживает публикации в виде отдельного издания.

Изложенное выше дает основание заключить, что диссертационная работа «Иммунохроматографические системы: молекулярные закономерности функционирования и практические приложения» представляет собой целостное оригинальное экспериментальное исследование, которое по актуальности, достоверности, научной и практической значимости соответствует критериям, предъявляемым к докторской диссертации пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, в действующей редакции с учетом внесенных изменений и условиям представления диссертационной работы на соискание ученой степени доктора наук в форме научного доклада, установленным постановлением Правительства РФ от 20 марта 2021 г. № 426 и приказом Министерства науки и высшего образования РФ от 7 июня 2021 г. № 458 с учетом порядка применения этих условий в 2022 г., определенного постановлением Правительства РФ от 19 марта 2022 г. № 414, а ее автор, Анатолий Виталиевич Жердев, несомненно, заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории иммунохимии
Института биохимии и физиологии
растений и микроорганизмов –
обособленного структурного подразделения
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра
“Саратовский научный центр
Российской академии наук”(ИБФРМ РАН)
410049, г. Саратов, пр. Энтузиастов, 13
Тел.: +7(8452)970403;
E-mail: dykman_l@ibppm.ru

— Лев Абрамович Дыкман

Подпись Л.А. Дыкмана «ЗАВЕРЯЮ»
Ученый секретарь ФИЦ СЦ РАН, к.б.н.



О.Г. Селиванова

5 сентября 2022 г.