

УТВЕРЖДАЮ

И.о. ректора федерального государственного
автономного образовательного учреждения
высшего образования «Казанский (Приволж-
ский) федеральный университет»,
д.ф.-м.н., профессор
Дмитрий Альбертович Таюрский

« 31 »  2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Жердева Анатолия Витальевича «Иммунохроматографические системы: молекулярные закономерности функционирования и практические приложения», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук (в форме научного доклада) по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы исследования. Методы иммунохимии являются основными в качественном и количественном анализе широкого круга органических и (в меньшей степени) неорганических субстратов, востребованных в медицинской диагностике, фармацевтике, эколого-аналитическом контроле и пищевой промышленности. Высокая селективность биохимического распознавания в системе антиген – антитело и возможности регистрации образования комплексов посредством простых и надежных способов, не требующих громоздкого и дорогостоящего оборудования, привели к тому, что иммуноанализ полностью вытеснил из практики биохимических лабораторий альтернативные решения, например, жидкостную и газо-жидкостную хроматографию, активно применявшуюся в 70-х годах 20 века. Распространению методов иммуноанализа способствовали также развитие иммунологии как теоретической основы селекции антител и характеристики их аффинности в отношении целевых субстратов, а в последнее время – взрывное развитие методов и устройств тестирования в рамках концепции оказания помощи у постели больного (point-of-care testing). Однако, несмот-

ря на кажущуюся простоту целевой реакции (обратимое образование комплекса состава 1:1), ее реализация в конкретных условиях формирования биочувствительного слоя (изготовления иммунотеста) и измерения сигнала встречается с множеством осложнений, имеющих как фундаментальную биохимическую природу (гетерогенность состава нарабатываемых антител, наличие в молекулах аналитов нескольких антигенных детерминант, образование иммунокомплексов более сложной стехиометрии), так и связанных со способом реализации конкретного формата измерения сигнала (неспецифическая адсорбция, кинетические ограничения доступа иммунореагентов, различные закономерности гомогенных и гетерогенных стадий процесса). Это особенно актуально для иммунохроматографических методов (проточно-латерального иммуноанализа) как основы современных тест-устройств с большими перспективами развития и внедрения в медицинскую практику.

В этой связи **цель** представленной диссертации А.В.Жердева, связанная с выявлением закономерностей взаимодействия антиген–антитело при проведении иммунохроматографии и разработке новых аналитических систем, основанных на применении этих закономерностей, является **актуальной, научно и практически значимой**.

Достижение поставленной цели включало решение широкого круга задач, связанных с характеристикой способов измерения параметров комплексообразования антиген–антитело; классификацией взаимодействий в иммуноаналитических системах, развитием теории образования иммунокомплексов с участием нативных и модифицированных иммунореагентов; выработкой подходов к ограничениям диффузионно-контролируемых реакций акциями. Все найденные закономерности были с успехом применены для разработки иммунохроматографических систем с низкими пределами обнаружения аналитов и высокой производительностью проведения измерения.

Методология исследования. В качестве объектов исследования были выбраны антигены, имеющие значение в медицине, ветеринарии, экологии и пищевой промышленности, в основном относящиеся к классу гаптен (низкомолекулярные соединения - пестициды, поверхностно-активные вещества, антибиотики,

мико- и фитотоксины, психоактивные вещества, биомаркеры инфаркта миокарда). Также были исследованы системы для определения традиционных биомаркеров белковой природы, маркеры для идентификации сырья в мясных продуктах, антитела к аллергенам и клеткам бактерий, вирусные и бактериальные патогены). Следует отметить, что выбор аналитов был обусловлен высокой потребностью в создании соответствующих тестов и опирался на ближайшие перспективы реализации разработок в виде иммунохроматографических тестов.

Базируясь на комплексе современных физико-химических методов, принятых в иммунохимии, А.В. Жердев установил количественные характеристики иммунных реакций с расчетом кинетических и термодинамических констант взаимодействий в зависимости от конкретных условий протекания реакций и использовал полученные данные для построения математических моделей (проточные системы) и формулирования общих закономерностей, призванных связать характеристики иммунохроматографических тест-систем с оптимизируемыми параметрами их функционирования.

Структура диссертации и основное содержание работы. Собственные результаты соискателя представлены в виде семи законченных глав, имеющих сходную структуру и построенных по принципу последовательного усложнения исследуемых иммунохроматографических систем и решаемых с их помощью задач. Каждая глава содержит краткую характеристику предшествующих работ (аналог state-of-the-art), изложение полученных собственных экспериментальных результатов и краткие выводы на их основе.

Глава 1 содержит описание подходов к количественной оценке взаимодействия антиген-антитело с упором на специфику, привносимую моно- и поливалентными антигенами и возможностями, связанными с использованием наноразмерных носителей для иммобилизации антител.

Глава 2 предлагает единую систему критериев для классификации форматов гетерогенных иммунохимических взаимодействий и применение ее для выбора оптимальной схемы измерений. Также описана математическая модель неравновесных гомогенных и гетерогенных систем, обладающая предсказательными возможностями в оценке поведения подобных систем и при выборе экспе-

риментальных условий измерения содержания аналитов. Помимо традиционного сэндвичевого анализа подход позволил предложить ряд альтернативных форматов измерения, отличающихся повышенным аналитическим сигналом и снижением детектируемых концентраций аналитов.

Глава 3 рассматривает особенности поведения иммунореагентов при их конъюгации с нано- и субмикрочастицами. Предложены новые подходы к флуориметрическому определению связывания по сигналу триптофана, проведена количественная оценка антиген-связывающих сайтов в соответствующих адсорбционных комплексах. Рассмотрен широкий перечень альтернативных наночастиц носителей, включающих золото с нетрадиционной формой частиц, квантовые точки и композиты нескольких функционализированных наночастиц.

Глава 4 посвящена рассмотрению вопросов селективности определения структурно родственных соединений. На основе моделирования кинетических зависимостей сформулированы критерии выбора условий иммуноопределения в зависимости от требуемой селективности (индивидуальной и групповой), включая использование кинетических критериев разделения и включение гаптенных конъюгатов с носителями. Предложены подходы к выделению структурных элементов аналитов, определяющих эффективность их связывания с антителами.

Глава 5 идеологически продолжает главу 4, рассматривая особенности мультиплексного иммуноанализа. Рассмотрено влияние положения и размера зон связывания иммунохроматографического тест-устройства на эффективность разделения и чувствительность определения индивидуальных аналитов.

Глава 6 содержит описание подходов к изменению пределов обнаружения иммунохроматографических систем. Анализ факторов носит системный характер и привязан к различным стадиям реализации иммунохроматографического анализа. Помимо влияния на кинетику переноса иммунореагентов посредством контроля ламинарного характера процесса и использования длительно растворяющихся реагентов и дополнительных мембран, предложено сочетание нескольких функционализированных носителей, включая нанозимы, проявляющие каталитическую активность.

Заключительная глава 7 посвящена конкретным аналитическим системам для решения задач медицинской диагностики, контроля качества потребительской продукции и загрязнения окружающей среды, реализующим весь комплекс инновационных решений и подходов, описанных в предыдущих главах. Определены особенности реализации иммунохроматографических систем при анализе проб различного состава, в том числе, в присутствии органических растворителей – экстрагентов, с учетом термостабильности белков при анализе мясной продукции и др.

Диссертация завершается *выводами и рекомендациями*, содержащими основные положения, составляющие научную новизну и описание перспектив развития иммунохроматографического анализа на основе полученных в диссертации экспериментальных результатов. Выводы следуют из представленного фактического материала, сформулированы на высоком научном уровне, логичны и отражают основные достижения проделанного огромной работы.

Научная новизна и практическая значимость. Диссертационная работа А.В. Жердева – комплексное систематическое исследование, призванное решить проблемы, достаточно универсальные для современных иммунохроматографических исследований и обусловленные многостадийным характером процессов и неопределенностями взаимодействия иммунореагентов. Если проводимые ранее отдельные исследования оптимизировали сугубо локальные элементы тест-систем и требовали достаточно трудоемких исследований при любом изменении конструкции тест-систем и природы иммунореагентов, А.В. Жердев на основе собственных исследований сформулировал универсальные способы направленного воздействия на характеристики основных элементов иммунотестов (в основном иммунохроматографических) с учетом во многом разнонаправленного влияния факторов гомогенных и гетерогенных стадий процессов и сложностей массопереноса иммунореагентов в тест-системах. Предложенные и обоснованные алгоритмы многократного снижения пределов обнаружения, связанные с применением наноразмерных носителей, использованием нестационарных (неравновесных) режимов протекания реакций и измерения сигнала, имеют универсальный характер и могут быть непосредственно использованы при создании но-

вых тест-систем на иные, чем описанные в работе, аналиты. Большое практическое значение имеет совокупность методических приемов, направленных на достижение требуемых характеристик определения аналитов в зависимости от конкретной поставленной задачи (индивидуальная – групповая селективность, мультиплексный анализ и пр.). Полученный научный инструментарий был с успехом использован для разработки конкретных иммунохроматографических аналитических систем, включая тесты на загрязнители окружающей среды, сельскохозяйственной продукции и пищевых продуктов, маркеров происхождения сырья в мясных продуктах, объектов серодиагностики инфекционных заболеваний и аллергических реакций. Следует также отметить 15 патентов РФ на изобретения и 8 патентов на полезные модели РФ, а также 2 инновационных патента Республики Казахстан на изобретения, полученные автором по материалам исследований, вошедших в диссертационную работу.

Соответствие специальности. Тема диссертации А.В. Жердева и полученные экспериментальные результаты отвечают паспорту специальности 1.5.4 - Биохимия (отрасль науки – химические) согласно п. 1. «Проблемы строения, свойств и функционирования отдельных молекул и надмолекулярных комплексов в биологических объектах, изучение молекулярной организации структурных компонентов, выяснение путей метаболизма и их взаимосвязей», п. 2. «Термодинамические, квантово-механические и кинетические расчеты на уровне функционирования отдельных молекул, компьютерное моделирование пространственной структуры биополимеров и надмолекулярных комплексов, проблемы трансформации энергии в биосистемах, молекулярных основ эволюции, происхождения жизни и предбиологической эволюции», п. 18. Создание специальной биохимической аппаратуры. Разработка принципов инженерной энзимологии и способов применения биохимических процессов в промышленности».

Публикации по теме диссертации и апробация работы. Основные результаты диссертации представлены в 118 статьях в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ. Следует отметить, что это более половины от общего числа публикаций отечественных ученых по данной тематике за период 2013-2021 гг. К первому и второму квартилю международных библиографических баз данных отно-

ются 82 статьи. Таким образом, критерии достаточной опубликованности результатов исследований для защиты диссертации по научному докладу соблюдены. Неопубликованных результатов, вошедших в диссертацию, не обнаружено. В тексте имеются ссылки на собственные работы, содержащие исходный экспериментальные результаты.

Исследования А.В. Жердева по тематике диссертации были поддержаны грантами РФФИ и РФФИ, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России». А.В. Жердев удостоен в составе коллектива за разработки иммуноаналитических систем Премии Правительства РФ в области науки и техники за 2010 г. Результаты исследований по теме диссертации неоднократно докладывались на более чем 80 международных и всероссийских конференциях, включая итоговые доклады на конференции Euroanalysis XX, V Международной конференции «Наноматериалы и живые системы», II Всероссийской конференции «Химия биологически активных веществ» и XIV Международном биотехнологическом форуме «РосБиоТех».

Рекомендации по ознакомлению с результатами диссертационного исследования. С материалами диссертационной работы рекомендуется ознакомить научные и образовательные учреждения, занимающиеся разработками в области иммуноанализа и иммунохроматографии: Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Государственный университет «Дубна», Уральский федеральный университет имени первого президента Российской Федерации Б.Н.Ельцина, Московский физико-технический институт ((национальный исследовательский университет), Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения.

Замечания по диссертации. В целом по диссертации А.В. Жердева замечаний по существу представленных данных и уровню из обсуждения нет. Однако следует отметить некоторые недостатки, не имеющие принципиального характера:

1. Достаточно очевидно, что формат защиты по научному докладу является новым и для него нет устоявшихся шаблонов оформления диссертации. Однако одним из мотивов введения данной формы защиты явилось желание уменьшить трудоемкость оформления работы за счет исключения литературного обзора. В этой связи введение в каждой главе описания современного состояния дел, пусть и очень короткого, представляется не вполне логичным и оправданным. То же касается и некоторых иллюстраций (в целом имеющих просто потрясающее качество, достойное монографии солидного издательства) – достаточно странным было бы предполагать, что научная аудитория будет незнакома с общими принципами иммунохроматографии или движением реагентов в ходе выполнения собственно измерения.
2. Следует отметить, что деление материала на главы имело безусловный методический смысл, однако *a priori* не могло быть свободным от недостатков. В частности, одни и те же методические приемы, такие как использование наночастиц – носителей антител, оптимизация состав конъюгатов, «игра» со стадиями массопереноса, – оказались в разных главах и обсуждались независимо друг от друга. Анонсирование (совершенно справедливое) универсальности предлагаемых алгоритмов предполагает большую сопряженность глав в части обсуждения общим подходом.
3. Метрологическое обеспечение результатов измерений в ряде случаев грешит огрехами. Не везде графики сопровождаются доверительными интервалами экспериментальных точек, не указывается число параллельных измерений, в большинстве случаев мерой чувствительности измерения приводится предел обнаружения (иногда вместе с константами связывания). В табл. 7 предел обнаружения приводится как среднее с доверительным интервалом значений, что неверно. Возможно, имело бы смысл указывать на пределы определяемых концентраций, особенно учитывая сигмоидный характер концентрационных зависимостей. Впрочем, такие претензии скорее констатируют сложившуюся практику представления результатов иммуноанализа в целом.

4. Работа носит очень цельный характер, а совокупность объектов анализа имеет строгое и в целом понятное обоснование. Тем более странным было включение в нее одного примера создания тест-систем на основе аптамеров (рис. 43).

Указанные замечания не снижают общей положительной оценки диссертации. По объему, актуальности и научной новизне диссертация отвечает требованиям п. 9–10 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (редакция от 11.09.2021) "О порядке присуждения ученых степеней" (вместе с "Положением о присуждении ученых степеней"), предъявляемым к кандидатским/докторским диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, как научно-квалификационная работа, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области иммунохроматографического анализа. Ее автор, Жердев Анатолий Витальевич, заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия (отрасль науки – химические).

Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» протокол № 1 от «31» августа 2022 г.

Отзыв подготовил

Заведующий кафедрой аналитической химии,

Химический институт им. А.М. Бутлерова

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

профессор, д.х.н.

Евтюгин Геннадий Артурович

420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18
 тел. 8-843-2337491,
 e-mail: Gennady.Evtugyn@kpfu.ru
 31 августа 2022 г.

