

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени  
доктора химических наук Шляпникова Юрия Михайловича на тему:

**«Ультрочувствительные методы иммунохимического и  
гибридизационного анализа биомакромолекул с применением  
магнитных меток» по специальности 1.5.6. Биотехнология**

В настоящее время неуклонно растет спрос на простые, экспрессные методы детектирования широкого круга специфических биомаркеров различных социально-значимых заболеваний непосредственно у постели больного, не требующих дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала. Развитие этих подходов позволяет оказывать своевременную медицинскую помощь значительно большему количеству пациентов в короткие сроки, на ранней стадии развития заболеваний, что снижает нагрузку на здравоохранение во всем мире. При этом требования, предъявляемые к таким диагностическим сенсорным системам в настоящее время, все время повышаются и в ряде случаев по аналитическим характеристикам они должны соответствовать, а чаще превосходить методы химического анализа, основанные на использовании самого современного «тяжелого» оборудования, по чувствительности, селективности, скорости пробоподготовки и получению результатов, неинвазивности и так далее.

В связи с этим *цель диссертационной работы* Шляпникова Ю.М., направленная на разработку направления, связанного с созданием универсального набора аналитических методов и тест-систем на основе микрочипов с применением магнитных меток для высокочувствительного определения биомакромолекул в образцах сложного состава, и в развитии подходов для повышения эффективности твердофазного иммуноанализа является чрезвычайно актуальной и практически значимой.

Для достижения цели работы поставлены следующие задачи:  
1. Разработать подходы, позволяющие проводить ультрочувствительный

мультиплексный иммуноанализ на микрочипах с электрофоретическим концентрированием аналитов. Продемонстрировать применение разработанных методов и тест-систем для определения биотоксинов и биомаркеров различных заболеваний в реальных образцах сложного состава без предварительной (или с минимальной) пробоподготовки.

2. Изучить возможность неинвазивной диагностики туберкулеза лёгких по специфическим биомаркерам, содержащимся в выдыхаемых микрокаплях лёгочной жидкости.

3. Разработать методологию проведения ультрачувствительного и мультиплексного экспресс-анализа фрагментов ДНК на микрочипах. Изучить процесс повреждения молекул ДНК при электрораспылении и определить пригодность метода для производства ДНК-микрочипов.

4. Предложить новую стратегию для ускорения массопереноса аналита и снижения фонового сигнала в иммуноанализе на микрочипах за счет расщепляемого покрытия. Получить новые низкоадгезивные подложки для микрочипов на твёрдой основе для использования в автоматических анализаторах.

5. Разработать новые форматы электрофоретического разделения и концентрирования белков. Апробировать аналитические возможности новых устройств в анализе биологических объектов сложного состава, содержащих ультранизкие концентрации аналитов, в том числе, выдыхаемого воздуха.

6. Изучить возможность использования ультрачувствительного иммуноанализа для поиска новых биомаркеров онкологических заболеваний.

Положения, выносимые на защиту, обоснованы, достоверность полученных результатов подтверждается литературными сведениями в основном за последние двадцать пять лет, использованием современных методов исследования и передовых лабораторных практик в создании современных сенсорных технологий, статистической оценки погрешности измерений, а также высокой воспроизводимостью полученных данных.

Основные результаты работы были представлены на международных и российских конференциях: VII и VIII Международных конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2013, 2015), V Съезде биофизиков России (г. Ростов-на-Дону, 2015), 19, 20 и 24 Международных школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2015, 2016, 2020), Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни (Москва, 2018), XXXI зимней молодёжной научной школе «Перспективные направления физико- химической биологии и нанобиотехнологии» (Москва, 2019), VI Съезде биофизиков России (Сочи, 2019), Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2020), конференциях «Теоретическая и экспериментальная биофизика» (Пушино, 2017, 2018, 2020, 2021, 2022, 2023), XXI Конгрессе Российского общества урологов (Санкт-Петербург, 2021), 41 Конгрессе Международного общества урологов (Дубай, 2021), VII Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2022), XVII Международном Конгрессе Российского общества онкоурологов (Санкт-Петербург, 2022), II Евразийском Конгрессе урологов (Уфа, 2023).

Результаты по материалам диссертационной работы опубликованы в 17 статьях в рецензируемых научных журналах, индексируемых в Web of Science, Scopus (12 - в журналах 1 квартиля, 4 – в журналах 2 квартиля, 1 – в журнале 3 квартиля), и 3-х патентах.

Научная новизна работы заключается в проведении систематических исследований способов улучшения аналитических характеристик (чувствительности, селективности, точности и возможности осуществления мультуплексного анализа) в ультрачувствительном иммуноанализе с электрофоретическим сбором аналитов на микрочипах. Показано, что нанофильтры, изготовленные методом электрораспыления с газофазной нейтрализацией, имеют калиброванные поры и пригодны для сбора образцов

выдыхаемого воздуха и последующего их анализа с целью диагностики инфекционных заболеваний.

Разработан принципиально новый метод гибридизационного экспресс-анализа на микрочипах с электрофоретическим концентрированием фрагментов ДНК с ультравысокой чувствительностью (предел обнаружения 0.1 фМ).

Изучен механизм повреждения длинных молекул ДНК при электрораспылении.

В результате целенаправленного подбора полимеров разработана новая низкоадгезивная подложка из термически сшитой карбоксиметилцеллюлозы для изготовления микрочипов.

Предложена новая концепция химически расщепляемой защитной блокировки поверхности микрочипов. Применение этой технологии позволяет управлять смачиваемостью поверхности и, в результате, снизить фоновый сигнал и повысить скорость массопереноса аналитов.

Предложен подход для создания оригинальных электрофоретических устройств, позволяющих концентрировать белки в десятки тысяч раз за несколько минут.

Разработана оригинальная схема проведения иммуноблоттинга, предполагающая формат электрофоретического разделения аналитов в зазоре между мембранами без геля.

Работа состоит из введения, пяти глав основного текста диссертации, включающих обзор литературы и обсуждение основных результатов, заключения, выводов, списка литературы и списка основных публикаций по теме диссертации, благодарностей.

Научные выводы работы обобщают проведенные автором исследования и отражают вклад работы в современную науку. Заключение из работы целиком отражает основную цель проведенного исследования.

Диссертация соответствует направлениям специальности 1.5.6. Биотехнология.

Работа изложена на 249 страницах машинописного текста, содержит 106 рисунков и 27 таблиц, список литературы включает 391 ссылку. Работа логично и последовательно изложена по постановке задачи и представлению результатов, выводов, легко читается, в ней фактически отсутствуют опечатки, качественно и информативно оформлены таблицы и рисунки, список литературы. Текст автореферата отражает текст диссертации.

По диссертации имеются следующие вопросы и пожелания:

1. Непонятно как рассчитывали предел обнаружения (PrO) из приведенного в работе определения «Предел обнаружения определяли с помощью градуировочного графика как минимальную концентрацию анализируемого вещества, дающую в анализе положительный сигнал, с учётом данного уровня достоверности».
2. В работе приведено, что трехстадийная методика проведения мультиплексного гетерофазного иммуноанализа и разработанная тест-система позволяют одновременно выявлять пять бактериальных токсинов с пределом обнаружения до 0.1 пг/мл (1фМ) при времени анализа не более 10 минут в образцах сложного состава без предварительной (или минимальной) подготовки проб. Так все-таки какой величине соответствует предел обнаружения в этой системе 0.1 пг/мл или 1фМ?
3. В работе указано, что микрочипы изготавливали на активированной плазмой диализной мембране методом электрораспыления (ЭР). Автором работы впервые обнаружено, что линейные фрагменты ДНК длиной более 5 тыс. п.о. при электрораспылении подвергаются значительному механическому повреждению. При этом из литературы известно изначально, что повреждение ДНК происходит при электрораспылении, тогда возникает вопрос почему выбрали именно этот метод?

4. На рис. 15. в автореферате и на рис. 50 в диссертации приведены адгезия магнитных частиц к плёнке из КМЦ, измеренная методом «push-pull» в зависимости от концентрации NaCl, а также зависимости электростатической силы отталкивания между магнитной частицей диаметром 1 мкм и плёнкой из КМЦ в 1 мМ и в 10 мМ растворе соли. Почему это исследование выполнено только при двух значениях ионной силы. Можно было добавить еще точки 15 и 5 мМ, тогда утверждения автора были бы более убедительны.
5. Автор на протяжении всего представления исследования говорит о разработке количественных методов определения биомакромолекул, при этом заявляет о точности 30 %, что ближе к полуколичественным методам.

Указанные пожелания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.6. Биотехнология (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Шляпников Юрий Михайлович заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент: Доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии химического факультета Федерального

государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Веселова Ирина Анатольевна

15.03.2024

Контактные данные: тел.: +7(916)177-118, e-mail: VeselovaIA@my.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 02.00.02 – Аналитическая химия

Адрес места работы: 199991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 3, ГСП-2, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет Тел.: +7 (495) 939-16-71; e-mail: dekanat@chem.msu.ru

Личную подпись *Веселова И.А.*  
ЗАВЕРЯЮ:  
Нач. отдела делопроизводства  
химического факультета  
Самошина Д.