

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание учёной степени
доктора химических наук Шляпникова Юрия Михайловича
на тему: «Ультрочувствительные методы иммунохимического и
гибридизационного анализа биомолекул с применением магнитных меток»
по специальности 1.5.6. Биотехнология.**

Диссертационная работа Шляпникова Ю.М. посвящена крайне важной проблеме современной биотехнологии – развитию новых аналитических методов и систем для выявления биотоксинов, возбудителей бактериальных и вирусных инфекций, биомаркеров различных заболеваний, обладающих комплексом таких характеристик как быстрота, высокая чувствительность и невысокая стоимость. Поэтому актуальность работы Ю.М. Шляпникова не вызывает сомнений.

Несмотря на то что в работе представлен обширный экспериментальный материал, диссертация изложена компактно на 220 страницах (без списка литературы) и содержит 106 рисунков и 27 таблиц. Она состоит из введения, краткого литературного обзора, 4-х основных глав, объединяющих по несколько сходных по идейному содержанию самостоятельных частей. В конце приводится общее заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 391 источник. Следует отметить логичное построение диссертации, а также ясное и чёткое изложение полученных результатов. Приведу наиболее интересные. В первой главе рассматривается ультрочувствительный иммуноанализ с электрофоретическим сбором аналитов на микрочипах и детекцией сигнала магнитными метками на примере определения пяти кишечных токсинов. Для этого в качестве микрочипов использована мембрана из регенерированной целлюлозы и «активный» способ проведения анализа, разработанный совместно с д.ф.-м.н. В.Н. Морозовым. Автором предложена наиболее эффективная методология по проведению мультиплексного анализа бактериальных токсинов и показана его высокая специфичность. Так, менее чем за 10 минут, можно с чувствительностью до 0,1-1 пг/мл определить присутствие любого из изученных пяти токсинов в смесях сложного состава. Однако сам автор отмечает основной

недостаток такой тест-системы – а именно, высокую вариацию сигнала и, как следствие, низкую точность анализа. Для снижения величины стандартного отклонения им были предложены нововведения, которые повысили точность до 30%. Существенным результатом является определение области концентраций, в которой обнаружение аналита происходит наиболее точно. Практическое использование разработанных подходов автор продемонстрировал на примере бесконтактной диагностики туберкулёза по выдыхаемому воздуху. Здесь надо отметить особенность данной работы – автор решает, если необходимо, задачи любой сложности, выходящие за пределы его специальности. Так, им показано, почему нейлоновые нанофильтры, полученные электрораспылением с газофазной нейтрализацией, чрезвычайно однородны, что позволяет эффективно их использовать для сбора микрокапель выдыхаемого воздуха и дальнейшего анализа на туберкулёз. Проведённый им иммуноанализ является первым примером неинвазивной диагностики данного заболевания по специфическим маркерам. Вызывает, однако, сожаление явно неудовлетворительный сбор образцов у больных с помощью масок: этот технический вопрос явно нуждается в доработке, как и вопрос включения в панель биомаркеров воспаления для повышения специфичности анализа. Решив эти проблемы, можно значительно повысить эффективность метода.

Вторая глава посвящена применению активного способа анализа для высокочувствительного определения молекул ДНК. Первая проблема, которую впервые решал автор, - это получение ДНК-микрочипов на диализной мембране методом электрораспыления. Наиболее значимым научным результатом является изучение механического повреждения молекул ДНК в этом процессе. По моему мнению, эта часть выходит далеко за рамки диссертационной работы и имеет самостоятельное научное значение. В результате проведённых исследований автор разработал методологию ультрачувствительного гибридного анализа на микрочипах как одноцепочечных, так и двухцепочечных фрагментов ДНК, и провёл мультиплексный анализ трёх микроорганизмов, который за 5 минут позволил выявить до 100 клеток/мкл.

Наиболее инновационными являются следующие главы диссертации, в которых представлены методы без использования электрофореза. Так, в третьей главе представлена новая низкоадгезивная подложка на основе плёнки из сшитой карбоксиметилцеллюлозы. В работе дано собственное автору исчерпывающее исследование физико-химических свойств такой поверхности и приведён пример использования высокоспецифического анализа трёх бактериальных токсинов. Такие микрочипы на твёрдой основе могут использоваться в автоматических анализаторах.

Проблема повышения эффективности иммуноанализа за счёт снижения фонового сигнала решается в следующей части работы. Автор синтезировал и применил на практике расщепляемое покрытие, которое позволило повысить чувствительность анализа почти в 30 раз. Без использования «активной» стадии сбора аналита, удалось получить предел обнаружения, близкий к 1 фМ. Важным моментом является то, что анализ может проводиться одновременно на одном микрочипе на белковые маркеры и целые вирусы. С помощью данного подхода проведено выявление онкоурологических заболеваний по специфическим мочевым биомаркерам, которые из-за низких концентраций не могут быть определены другими методами. Важно, что показатели диагностической чувствительности и специфичности рака почки являются одними из лучших среди опубликованных значений.

В последней главе приведены новые форматы электрофоретического разделения и концентрирования белков. Необходимо выделить как чрезвычайно оригинальное изобретение конический электрофоретический концентратор для заряженных биомакромолекул. Как уже отмечалось, с присущей автору дотошностью изучены и подробно описаны все стадии процесса. Способ адаптирован как для отрицательно, так и положительно заряженных макромолекул. Показано, что белки могут быть сконцентрированы за 10-15 минут в 100 тысяч раз. Предложен также оригинальный способ использования такой высокой степени концентрирования с помощью активированных магнитных частиц.

Безусловно высокую важность имеет раздел, в котором рассматриваются нестандартные подходы, предложенные автором. Речь идет об улучшении аналитических характеристик других форматов гетерофазного анализа, а именно, иммуноблотинга, который в классическом варианте не обладает нужной чувствительностью. Автор разработал быстрый и высокочувствительный метод иммуноблоттинга с магнитными метками без геля, в котором исключается дополнительная стадия переноса белка из геля на мембрану, что повышает надёжность анализа. Такой метод полезен в случае анализа следовых количеств вещества в образце. Эффективность нового метода подтверждена детекцией туберкулёз-специфических и воспалительных биомаркеров в образцах выдыхаемого больным туберкулёзом воздуха, причем она оказалась близка к эффективности иммуноанализа с электрофоретическим сбором образца на микрочипе.

Подводя итоги, нельзя не отметить умение автора решать самые разные по сложности физико-химические задачи. Это свидетельствует об очень высоком уровне профессиональной химической подготовки. В целом представленный материал крайне разнообразен и сложен. Тем не менее, краеугольным камнем в работе является вопрос: в какой мере на настоящий момент использован потенциал магнитных частиц для детекции сигнала в анализе биомакромолекул. Это связано со следующими обстоятельствами. С одной стороны, магнитные частицы микронных размеров способны детектировать единичные молекулярные взаимодействия в гетерофазном анализе, что обеспечивает ультравысокую чувствительность. При этом метод прост и экономичен. С другой стороны, адсорбционные явления реагентов на поверхности микрочипа, которые зависят от ряда неконтролируемых факторов, вносят отрицательный вклад и приводят к значительному разбросу данных. Автор достаточно критически относится к полученным результатам и пытается привести доводы в пользу использования магнитных меток, предлагая способы улучшения структуры поверхности микрочипа, понижения фонового сигнала и снижения погрешности при измерении сигнала.

Следует еще раз подчеркнуть важные особенности диссертации. Во-первых, для решения поставленных задач разработаны новые оригинальные подходы, такие как концепция химически расщепляемого блокирования поверхности микрочипов, которая позволяет существенно снизить фон в иммуноанализе, а также управлять смачиваемостью поверхности микрочипа; совершенно новый метод иммуоблоттинга; сконструированы оригинальные электрофоретические устройства для высокоэффективного концентрирования биомакромолекул. Во-вторых, хочу особо отметить, что представленные в диссертации данные наглядно демонстрируют не только возможности и преимущества, но и недостатки предложенных методик. В целом у меня сложилось очень благоприятное впечатление от диссертационной работы: она свидетельствует о способности автора как к творческому поиску новых форматов химического анализа, так и к критическому анализу собственных результатов. Крайне важной стороной диссертации является детальное и исчерпывающее изучение каждого представленного в работе явления: будь то механизм повреждения ДНК или электроконцентрирование белков в конической ячейке. У меня нет серьёзных замечаний к данной работе.

Следует указать, что проведённые исследования привели к созданию нового направления – использование магнитных меток для высокочувствительного анализа биомакромолекул. Работа представляет собой полноценное завершённое исследование, выполненное на высоком экспериментальном уровне с привлечением современных методов исследования, вносящее весомый вклад в развитие биотехнологии. Кроме того, в ней разработаны новые оригинальные методические подходы, которые могут найти практическое применение в научных лабораториях. Полученные данные имеют большое теоретическое и практическое значение для дальнейших исследований в рассматриваемой области, их достоверность сомнений не вызывает. Выводы, сделанные в диссертации, хорошо обоснованы, убедительны и соответствуют полученным результатам и заявленным задачам. Вместе с тем, указанное выше замечание, касающееся

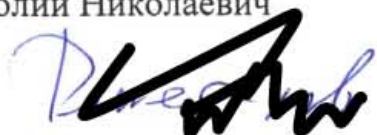
результатов анализа образцов больных туберкулёзом, не умаляет значимости диссертационной работы. Материалы диссертации полностью отражены в представленных патентах и статьях, опубликованных в высокорейтинговых международных изданиях первого и второго квартилей (в первую очередь, Analytical Chemistry). Представленный автореферат по содержанию полностью соответствует диссертации. Представленная работа несомненно 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 учёных степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание учёной степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

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

Официальный оппонент:

Доктор химических наук, профессор,
заведующий Лабораторией биосенсоров Института биохимии и физиологии
микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина Федерального исследовательского
центра «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»

Решетиллов Анатолий Николаевич



14 марта 2024 г.

Контактные данные:

тел.: 7(4967)73 86 20 доб. 600, e-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.01.06 – Биотехнология

Адрес места работы:

142290, Московская область г. Пущино, пр. Науки, д. 5, ИБФМ РАН

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина
Федерального исследовательского центра «Пущинский научный центр
биологических исследований РАН» (ФИЦ ПНЦБИ РАН) Лаборатория
биосенсоров

Тел.: 7 (4967) 73-26-36; e-mail: info@pbcras.ru

Подпись *Решетникова* *ЛН*
УДОСТОВЕРЯЮ
Начальник отдела кадров *ЛН*
14.03.2024

