

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

Доминирующей тенденцией в развитии аналитических систем для медицинской диагностики и обеспечения безопасности населения является поиск новых подходов, характеризующихся минимальными выявляемыми уровнями содержания целевых аналитов. На сегодняшний день описано большое число разнообразных разработок, предлагающих для снижения пределов обнаружения включение в специфические комплексы аналит-рецептор новых меток разной природы, регистрацию различных физических параметров для выявления таких меченых комплексов, управление последовательностями взаимодействия реагентов на структурированных подложках или в каналах, использование дополнительных каталитических процессов или каскадных взаимодействий для усиления сигнала. Однако в большинстве случаев ультрочувствительное тестирование включает использование дополнительных сложных устройств, что повышает стоимость анализа и требует параллельного развития новых технологий приборостроения. Поэтому крайне востребованы подходы, позволяющие сочетать низкие пределы обнаружения с простотой проведения аналитических процессов и регистрации получаемых результатов.

Исходя из вышеизложенного, диссертационное исследование Ю.М. Шляпникова, направленное на разработку аналитических систем с концентрированием реагентов в магнитном поле и микроскопической оценкой степени связывания наночастиц-маркеров, представляется крайне **актуальным**: интегрирующим достижения последних лет в области микрофлюидики и изучения наноматериалов для создания востребованных высокочувствительных аналитических систем.

Новые разработки в области биоаналитических систем, предлагающие универсальные подходы к снижению пределов обнаружения, должны учитывать существующие теоретические оценки факторов, влияющих на параметры аналитических методов, и обеспечивать обоснованное воздействие на лимитирующие стадии. Для неконкурентных аналитических систем с прямой зависимостью регистрируемого сигнала от концентрации аналита известно, что для достижения низких пределов обнаружения необходимо сочетание возможности выявления специфических аналит-рецепторных комплексов в крайне низких концентрациях с минимальным уровнем фонового сигнала. В большинстве предлагаемых в литературе разработок для обеспечения возможности зарегистрировать сигнал от образовавшегося комплекса используются те или иные дополнительные усиливающие реагенты и процессы, что ухудшает воспроизводимость специфических и неспецифических откликов сенсоров и ограничивает продвижение в область крайне низких концентраций. Альтернативные разработки, основанные на идентификации индивидуальных молекул или комплексов, ориентируются на использование дополнительных инструментальных средств для позиционирования и скрининга сенсорных поверхностей на наноразмерном уровне.

В данной ситуации Ю.М. Шляпниковым выбрано правильное направление исследований. Предлагаемые и характеризуемые в работе аналитические системы используют серийные средства оптической микроскопии, позволяющие проводить быструю регистрацию взаимодействий на больших поверхностях и последующую автоматическую обработку изображений для доказательной идентификации индивидуальных образовавшихся комплексов. Для быстрого связывания рецепторными молекулами с высоким выходом целевые молекулы, содержащиеся в пробе, электрофоретически концентрируются в приповерхностном слое аналитической ячейки. В качестве регистрируемого маркера применяются магнитные частицы, которые могут направленно перемещаться вблизи

модифицированной поверхности микрочипа, а потом индивидуально регистрироваться на микроскопических изображениях. Дополнительно разработаны средства модификации поверхности, минимизирующие неспецифическое комплексообразование.

Данная совокупность подходов обеспечивает снижение выявляемых концентраций аналитов на 3-4 порядка, что находится в соответствии с проведенными соискателем оценочными теоретическими расчетами и значительно расширяет практическую ценность реализуемой таким образом диагностики. Важно отметить, что описанная выше общая концепция успешно применена для различных видов микрочиповых систем и для широкого ряда аналитов – белковые токсины, патогенные бактерии, биомаркеры заболеваний, комплементарно взаимодействующие нуклеиновые кислоты. Тем самым в работе Ю.М. Шляпникова подтверждена универсальность разработанных подходов, возможность их дальнейшего использования для высокочувствительного выявления других диагностически значимых соединений.

При написании диссертации перед Ю.М. Шляпниковым стояла непростая задача интегрального изложения всего разнообразия проведенных работ. Исследование объединяет разработки аналитических систем разной конструкции и с разными принципами формирования детектируемых комплексов: иммуноанализ с электрофоретическим сбором аналитов на микрочипе, системы для сбора микрокапель легочной жидкости из выдыхаемого воздуха и последующей бесконтактной диагностики туберкулеза легких, гибридизационный анализ на микрочипах, иммуноанализ на низкоадгезивных подложках, системы с расщепляемым блокированием поверхности микрочипов, проточные ячейки для электрофоретического сбора аналита на магнитных частицах, иммуноблоттинг с фотохимической иммобилизацией белков и магнитными метками. Данные системы были успешно применены для

высококочувствительного определения белковых и корпускулярных антигенов в разных видах биопроб.

Подготовленная и представленная к защите работа, а также публикации по теме исследования обеспечивают возможность комплексной оценки полученных результатов. Не вызывает сомнения успешное достижение выбранной диссертантом цели и решение всех требуемых для этого задач. Ю.М. Шляпниковым разработан универсальный набор способов обеспечения высококочувствительного анализа посредством электрического и магнитного концентрирования, а также микроскопической регистрации связывания ультрадисперсных меток. Интеграция этих способов обеспечивает снижение пределов обнаружения на несколько порядков по сравнению с традиционными аналогами. Проведенные оценки количественных закономерностей аналитических взаимодействий в разработанных системах подтвердили потенциал предлагаемых подходов и корректность предложенных описаний процессов, обеспечивающих высококочувствительное детектирование. Разработки успешно применены для разных практически значимых задач медицинской диагностики.

Научную новизну работы определяет проведенный анализ взаимодействий в предложенных аналитических системах и обоснование принципов, обеспечивающих высококочувствительное выявление целевых соединений. Совокупность полученных данных позволяет сформулировать и обосновать общие закономерности изменений аналитических параметров (чувствительность, воспроизводимость) при иммунодетекции различных антигенов на микрочипах с различными воздействиями компонентов реакционной среды. Следует также отметить, что, наряду с решением основных задач, соискателем в ходе работы с разными видами объектов изучен механизм повреждения длинных молекул ДНК при электрораспылении, предложена новая концепция химически расщепляемой защитной блокировки поверхности микрочипов.

Практическая значимость и конкурентный потенциал разработок следуют из успешной реализации систем детекции разных аналитов со значительными снижениями пределов обнаружения при использовании простых компактных устройств для проведения специфических взаимодействий и регистрации образующихся комплексов. В частности, для неинвазивной диагностики легочной формы туберкулеза по выдыхаемому воздуху разработан способ проведения иммуноанализа с применением оригинальных нанофильтров. Предложены способы модификации поверхности мембран из целлюлозы для изготовления ДНК-микрочипов. Разработаны электрофоретические устройства, обеспечивающие быстрое концентрирование белков, система иммуноблоттинга без переноса реагентов на мембрану.

Работы по всем направлениям исследования корректно спланированы и детально описаны в диссертации и статьях соискателя. Интерпретация результатов опирается на аргументированный анализ полученного массива данных, сопоставление с физическими моделями процессов в разрабатываемых системах. Сравнительные оценки и выводы о значимости характеризуемых факторов основываются на доказательной статистической обработке экспериментальных данных. Для характеристики реагентов и сенсорных поверхностей используется комплекс современных взаимодополняющих инструментальных методов. Эти соображения, а также подтверждение эффективности предложенных подходов для разных биосенсорных систем и разных аналитов позволяют однозначно констатировать обоснованность выносимых на защиту положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Текст диссертации логично и полно отражает объем проведенных исследований и полученные результаты. Автореферат дает корректное и информативное описание диссертационной работы.

Подготовленная Ю.М. Шляпниковым работа в полной мере соответствует специальности 1.5.6. Биотехнология, а именно ее направлению

«Разработка научно-методических основ для применения стандартных биосистем на молекулярном, клеточном, тканевом и организменных уровнях в научных исследованиях, контроле качества и оценки безопасности использования пищевых, медицинских, ветеринарных и парфюмерно-косметических биопрепаратов».

По теме исследования опубликовано 17 статей в журналах, индексируемых международными базами данных, в том числе 12 – в изданиях первого квартала. Стоит особо отметить 8 статей в журнале «Analytical Chemistry» – ведущем международном издании в данной тематической области. Получено три патента РФ на изобретения. Проведенные исследования обеспечили успешное выполнение проектов ФЦП «Национальная техническая база», Фонда «Сколково» и Российского научного фонда. Результаты диссертационной работы представлены на значительном числе профильных научных мероприятий; правда, большинство из них охватывало только отечественную аудиторию.

При ознакомлении с диссертацией и авторефератом возникли некоторые замечания и вопросы.

1. Электроконцентрирование с переходом целевых молекул в приповерхностный объем сенсора, на порядки меньший исходного объема пробы, сопровождается аналогичным концентрированием других одноименно заряженных компонентов пробы. При этом, начиная с определенной концентрации таких компонентов в пробе, сконцентрированный препарат перестает быть истинным раствором, что препятствует контактам для формирования иммунных комплексов. Возникают ли при этом ограничения на реализацию иммуноанализа с электроконцентрированием при работе с теми или иными видами проб?

2. Как соотносятся с литературной информацией результаты обнаружения в выдыхаемом воздухе кандидатных биомаркеров, представленные в Таблице 3 (стр. 54)? Имеет смысл обсудить потери клеток

на фильтрах при пробоподготовке как фактор, влияющий на выявление фрагментов ДНК.

3. Величины регистрируемых сигналов для концентраций ДНК, соответствующих пределу обнаружения и выходу концентрационных зависимостей на плато, отличаются менее чем в 10 раз (рис. 31). При этом верхнее плато характеризуется весьма плотным покрытием поверхности меткой, достигающей до формирования сплошных окрашенных участков. С другой стороны, неспецифическое связывание крайне низкое – 1-3 частицы на зону связывания. В данной ситуации рассмотрение ряда препаратов с меньшими отличиями в концентрациях позволило бы провести более точную характеристику пределов обнаружения.

4. Успевают ли пройти полное удаление поверхностного слоя жидкости на каждом цикле вращения в экспериментах, описанных на стр. 144? На чем основывалось последующее (стр. 153) решение об инкубации данной системы в течение ночи, то есть о проведении $\sim 10^4$ смен жидкости, контактирующей с поверхностью чипа?

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Они носят частный и дискуссионный характер, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту, и не снижают общую положительную оценку работы.

Диссертация Ю.М. Шляпникова 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. Диссертация оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций 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,
руководитель отдела лиганд-рецепторных
взаимодействий и биосенсорики;
заведующий лабораторией иммунобиохимии
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)

ДЗАНТИЕВ Борис Борисович



«15» марта 2024 г.

Контактные данные:

тел.: 8-495-954-31-42 . E-mail: dzantiev@inbi.ras.ru
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена докторская диссертация:
03.00.04 – Биохимия

Адрес места работы:

119071 Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
ФИЦ Биотехнологии РАН, лаборатория иммунобиохимии
Тел.: 8-495-954-52-83; e-mail: info@fbras.ru

*Подпись сотрудника ФИЦ Биотехнологии РАН
Дзантиева Бориса Борисовича удостоверяю*

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН, к.б.н.



«15» марта 2024 г.



А.Ф. Орловский