

## О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию Серебренниковой Ксении Вячеславовны «Высокочувствительные экспресс-методы латерального проточного иммуноанализа биомаркеров для целей медицинской диагностики», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – «Биотехнология» (в том числе бионанотехнологии)

Ранняя обращаемость пациентов к врачам способствует повышению эффективности назначаемой терапии, снижению заболеваемости и увеличению продолжительности жизни. При этом особую важность приобретает проведение надежных диагностических определений, достоверно позволяющих установить развитие патологических нарушений, особенно на ранних этапах их развития. Этому служат методы экспресс-анализа, отличающиеся простотой, надежностью и быстротой получения диагностических данных. К таким средствам относят методы иммуноанализа, воплотившиеся в клинической практике в форме радиоиммуноанализа (РИА), иммуноферментного анализа (ИФА) и отвечающего стратегии анализа «вне лабораторных условий» или «рядом с пациентом» - метода латерального проточного иммуноанализа (ЛПИА, называемого ещё иммунохроматографическим). Актуальность развития и применения ЛПИА обусловлена непродолжительностью его выполнения (10-15 минут), простотой проведения анализа, возможностью визуальной регистрации результатов. Значимость для современной медицинской диагностики своевременного и достоверного выявления сепсиса и бактериальных инфекций (отличающихся непозволительно высоким уровнем летальности от сепсиса) подчеркивает важность поиска надежных маркеров системной воспалительной реакции. В качестве эффективного маркера сепсиса и бактериальных инфекций был обнаружен и выделен белок прокальцитонин (ПКТ), уровень которого в крови пациента растет пропорционально тяжести заболевания. Недостатки обычных специализированных аналитических

методов определения ПКТ (высокая стоимость, длительность проведения) обусловили актуальность разработки простых и недорогих тест-систем для полуколичественного или количественного экспресс-определения ПКТ в сыворотке крови человека. Целью диссертационного исследования К.В. Серебренниковой стала разработка методов ЛПИА для количественного и визуального полуколичественного определения ПКТ в клинически важных интервалах его концентраций для выявления и контроля развития сепсиса.

Диссертация изложена на 145 страницах, содержит 13 таблиц и 51 рисунок. Работа имеет традиционное построение, библиография включает 186 наименований.

В Обзоре литературы соискатель последовательно знакомит со строением тест-полоски ЛПИА, его стандартными компонентами (антителами, мембранами разного назначения, метками), системами преобразования сигнала ЛПИА для проведения количественного определения исследуемого аналита. Критический анализ собранных данных литературы позволяет автору обоснованно заключить, что методы ЛПИА, основанные на регистрации флуоресцентного сигнала, требуют применения необходимого инструментального оборудования. В результате такие тест-системы нельзя отнести к простым, быстрым и недорогим методам определения ПКТ. Такое положение подтверждает актуальность разработки экспрессного, полуколичественного и недорогого ЛПИА теста для определения диагностически значимых интервалов концентраций ПКТ в сыворотке крови человека. Внятность рассмотрения представленных данных литературы способствовала обоснованному определению диссертантом цели его работы, формулированию и постановке её исследовательских задач (стр. 59).

В разделе Экспериментальная часть соискатель подробно приводит описание использованных реагентов и материалов, оборудования и

применяемых методов исследования. Указанные данные достаточны для воспроизведения полученных результатов.

Раздел Результаты и обсуждение опирается на богатый экспериментальный материал, представленный соискателем в диссертационном исследовании. Аргументированное обособление двух факторов чувствительности метода ЛПИА – используемые метки и методы регистрации результатов анализа – способствовали стройному представлению полученных автором результатов работы. Последовательно были изучены наночастицы золота (НЧЗ) сферической формы (в качестве метки), подобраны оптимальные условия получения их стабильных конъюгатов со специфическими антителами, обоснованно выбраны аналитическая мембрана (CNPC) в комбинации с мембраной для образца (GFB-R4). Продолжительность анализа для стандартного ЛПИА составила 10 минут, а предел обнаружения антигена 0,50 нг/мл. Такие данные не способствуют определению ПКт в интервале концентраций 0,25 – 0,50 нг/мл, характерном для локальной бактериальной инфекции организма, обосновывая задачу повышения чувствительности метода благодаря снижению предела обнаружения ПКт. Её решение связано с модификацией метки или введением дополнительных стадий анализа; использованием новых меток; оптимизацией анализа или системы регистрации сигнала. Развитие указанного выше подхода опиралось на применение двойной метки (конъюгат НЧЗ с антителами, предварительно уже связанными с пероксидазой хрена), укрупнение размера НЧЗ (в результате конъюгирования биотинилированных антител с НЧЗ через стрептавидин); использование несферических НЧЗ большого размера (в виде попкорна /цветов/ и звезд); усиления сигнала НЧЗ серебром; применение полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов (квантовых точек) в качестве метки; использование гигантского комбинационного рассеяния как метода детекции сигнала. Если чувствительность стандартного ЛПИА (НЧЗ сферической

формы) не позволяет определить концентрации ПКТ в необходимом интервале, то может быть выбран один из описанных выше подходов, отвечающий предъявляемым к анализу требованиям и задачам (Таблица 7, стр. 106).

Моделирование планируемого подхода на тест-системе определения хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) стало основой для разработки полуколичественного, визуального и быстрого метода градиентного ЛПИА на ПКТ. Сравнение результатов градиентного ЛПИА с данными ИФА обнаружило хорошую сходимость для концентрации ПКТ выше 2 нг/мл. Разработанные на основе градиентного ЛПИА тест-системы позволяют быстро (в течение 10 – 15 минут), визуально и с высокой чувствительностью определять пять клинически значимых интервалов концентраций ПКТ, обещая перспективность их клинического применения.

К дискуссионным моментам диссертационного исследования относится отсутствие данных продолжительности анализа в Таблице 12 (стр. 126 диссертации) и в Таблице 2 (стр. 19 автореферата). Указание этого параметра изредка в тексте затрудняет его системное восприятие, хотя эта характеристика определяет перспективу выбора конкретного метода ЛПИА для практического использования. Приведение значений продолжительности анализа в итоговых (резюмирующих) Таблицах явно способствует повышению четкости представления полученных результатов.

Замеченное количество ремарок/опечаток довольно мало (стр. 23, 120 /Рис. 50/, 144, 145 /ссылки 173 и 184/), свидетельствуя о весьма аккуратном и гармоничном оформлении работы.

Хотелось бы пожелать соискателю использовать более утвердительную форму Выводов работы (стр. 128-129). В представленном виде они (Выводы) носят порой аннотационный характер.

Приведенный диссертантом Список литературы (стр. 130-145) отличает 34 % содержание в нем работ, опубликованных за последние пять полных лет. Такое соотношение аргументировано указывает на актуальность выбранного исследовательского направления и его заметное современное развитие.

Полученные результаты работы представляют планомерное применение наночастиц золота в разных модификациях как метки для определения ПКТ методом ЛПИА. Научная новизна диссертационного исследования ассоциируется с достижением снижения предела обнаружения ПКТ, представлением выбора тест-систем ЛПИА для конкретных условий определения исследуемого антигена. Эффективность тест-системы на основе градиентного ЛПИА для определения клинически значимых интервалов концентрации ПКТ в сыворотке крови человека подтверждает практическую значимость выполненной работы. Автореферат отражает основные результаты диссертационного исследования.

Тщательная аргументированность доводов диссертанта обуславливает представление им надежных выводов работы. Перспективность полученных данных для клинической апробации демонстрирует их преемственность с будущими этапами представленного нам междисциплинарного изучения. Внятность настоящих данных, ясность их изложения отчетливо показывают достоверность и новизну выполненного диссертационного исследования.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.06 – «Биотехнология» (в том числе бионанотехнологии) (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, и оформлена согласно приложениям

№ 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, по моему мнению, соискатель Ксения Вячеславовна Серебренникова заслуживает присвоения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – «Биотехнология» (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор

отдела биоинженерных технологий и поддержки научных исследований

Института экспериментальной кардиологии «Национального Медицинского Исследовательского Центра кардиологии»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Максименко Александр Васильевич



« 8 » июня 2018 года

Контактные данные:

тел.: 8 (495) - 414-60-25, E-mail address: [alex.v.maks@mail.ru](mailto:alex.v.maks@mail.ru)

Специальности, по которым официальным оппонентом защищена докторская диссертация:

14.00.06 – Кардиология и 03.00.04 – Биохимия

Адрес места работы: 121609 Москва, 3-ья Черепковская улица 15А, ФГБУ НМИЦ кардиологии МЗ РФ, отдел биоинженерных технологий и поддержки научных исследований Института Экспериментальной Кардиологии

Тел.: 8 (495) – 414-63-33, [www.cardioweb.ru](http://www.cardioweb.ru)

Подпись профессора А.В. Максименко заверяю

Ученый секретарь ИЭК  
ФГБУ НМИЦ кардиологии МЗ РФ  
доктор медицинских наук  
О.С. Плеханова  
« 8 » июня 2018 года

