

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Грибас Анастасии Владимировны
«Хемилюминесцентные иммуно- и олигонуклеотидные методы анализа с применением пероксидазы и пероксидаза-подобного ДНКзима»,
представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

В последние годы резко возросла научная активность в области разработки и характеристики новых методик регистрации маркеров в биоаналитических системах. Фактически мы имеем дело со второй волной интереса к этим проблемам. Ранее проводившийся широкий скрининг маркеров и подходов к их регистрации обеспечил выбор узкой панели вариантов, используемых в серийно производимых диагностикумах и адаптированных к приборным средствам регистрации. В сложившейся ситуации интерес к частным улучшениям, требующим при массовом применении существенного переоснащения аналитических лабораторий, становился сравнительно ограниченным. Однако изменившиеся требования к аналитическим методам, ориентированные на экспрессную, высокопроизводительную мультипараметрическую диагностику в разнообразных видах биоматриков, обусловили интерес к новым методическим решениям для выявления и оценки содержания биоаналитических маркеров и содержащих их специфических комплексов. Одним из объектов такой перспективной ревизии является пероксидазный маркер в сочетании с методиками его высокочувствительной регистрации. Наряду со стандартными протоколами колориметрической и хемилюминесцентной детекции ферментной метки, применяемыми при серийных анализах, становятся востребованными новые варианты, обеспечивающие снижение пределов обнаружения контролируемых аналитов. Использование маркеров для тестирования в разных средах, с разными режимами хранения аналитических систем определяет интерес к альтернативам традиционных ферментных маркеров. В этой связи активно развиваются решения, основанные на получении наноструктурированных катализаторов небелковой (органической или неорганической) природы, которые в ряде случаев не уступают естественным ферментам по каталитической активности, но позволяют работать в более широком диапазоне температур, в присутствии агрессивных растворителей, эффективно регенерироваться для повторных измерений.

Представленный выше анализ свидетельствует о несомненной **актуальности** диссертационной работы А.В. Грибас, целью которой являлась разработка новых эффективных биоаналитических решений, основанных на применении пероксидазы и ее

миметиков в сочетании с высокочувствительными хемилюминесцентными детектирующими системами.

Поставленная цель исследования была успешно достигнута соискателем, о чем свидетельствует подготовленная ей диссертация. В результате выполненных исследований А.В. Грибас разработала ряд новых биоаналитических систем, в которых применены предложенные ей оригинальные подходы по снижению пределов обнаружения каталитических маркеров – пероксидазы и пероксидаза-подобного ДНКзима – с соответствующим снижением пределов обнаружения целевых аналитов.

Диссертационная работа А.В. Грибас построена по традиционной схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, описывающей материалы и методы исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы (210 ссылок). Работа изложена на 126 страницах, содержит 58 рисунков и 9 таблиц.

Во вводной части обосновывается значимость и актуальность изучаемых проблем, приводятся задачи диссертационного исследования и выносимые на защиту положения.

Обзор литературы объединяет разделы, посвященные разнообразию существующих биоаналитических методов, основанных на применении антител и олигонуклеотидов. Автор детально рассматривает классификацию этих методов, их эволюцию, преимущества, достигнутые благодаря применению новых методических решений. Особое внимание уделено аналитическим параметрам иммуноферментного анализа, а также особенностям аптамеров как новых рецепторных молекул для биоаналитических систем. Анализ литературы проведен на высоком уровне и дает адекватное представление о современном состоянии развития биоаналитических систем. Возможно, автору стоило бы уделить большее внимание оценке современного уровня разработок по высокочувствительной детекции пероксидазной активности маркеров, а рассмотрение различных форматов иммуноферментного анализа и амплификационного анализа, широко представленное в литературе и менее критичное при планировании собственных экспериментов – сократить. Однако и в настоящем виде подготовленный литературный обзор представляет собой качественный, высокоинформативный источник информации, полезный для дальнейшей интерпретации оригинальных результатов диссертанта. Рассмотрено значительное число публикаций, включая результаты исследований последних лет – особенно в области аналитических систем с использованием реакции усиленной хемилюминесценции. Литературный обзор свидетельствует о высокой квалификации А.В. Грибас как специалиста в области биотехнологии.

В разделе «Экспериментальная часть» представлены материалы и методики, использованные при проведении работ. Подробно описаны разработанные аналитические методики, способы пробоподготовки, обработка результатов измерений. Представлены методы, применявшиеся для получения специфических аналитических реагентов и характеристики их структуры. Методический инструментарий выбран в полном соответствии с задачами исследования. Подробное описание использованных методов обеспечивает однозначную интерпретацию обсуждаемых далее результатов. В целом раздел «Экспериментальная часть» отражает высокую экспериментальную квалификацию соискателя.

Раздел «Результаты и их обсуждение» демонстрирует полноту проведенного исследования, успешность решения всех поставленных задач. Показана эффективность 3-(10'-фенотиазинил)-пропан-1-сульфоната натрия (ФТПС) и 4-морфолинопиридина (4-МП) в качестве усилителей хемилюминесцентного сигнала, продуцируемого пероксидазой хрена, в иммуноферментном анализе (ИФА). Изучено применение 3-(10'-фенотиазинил)пропионовой кислоты (ФПК) в комбинации с 4-МП в качестве усилителя в реакции хемилюминесценции в ИФА и олигонуклеотидном анализе. Показана эффективность пероксидаза-подобного ДНКзима – комплекса гемина и его аптамера – как миметика пероксидазы биоаналитического назначения.

В работе использованы обоснованно выбранные методические решения, позволяющие делать однозначные выводы. Измерения проводились с необходимым числом повторностей и адекватным комплексом контрольных экспериментов. Формулируемые заключения основаны на корректной статистической обработке получаемых данных. Формулируемые выводы аргументированы, логично вытекают из экспериментальных данных, полностью соответствуют целям и задачам исследования. Таким образом, **обоснованность и достоверность** сформулированных в диссертации положений не вызывает сомнения.

Диссертационная работа А.В. Грибас полностью **оригинальна**, описывает новые полученные автором результаты, значимые для решения фундаментальных и прикладных задач биотехнологии.

Фундаментальное значение полученных результатов состоит в изучении оригинальных систем усиления хемилюминесцентного сигнала, их сопоставлении с ранее описанными системами, анализе механизмов влияния усилителей на хемилюминесценцию. Помимо этого, диссертантом предложены перспективные конструкции аналитических реагентов и охарактеризованы их структурные особенности,

обеспечивающие эффективность биорецепторных взаимодействий и генерации аналитического сигнала.

Научно-практическая значимость разработки определяется созданием и подтверждением преимуществ ряда оригинальных биоаналитических систем. Разработанные новые хемилюминесцентные системы позволяют определять афлатоксин В1, метилглиоксаль-модифицированные липопроотеины низкой плотности и фрагмент ДНК вируса гепатита В. Проведена апробация аналитических систем: для детекции афлатоксина В1 – в растительных пищевых продуктах, для детекции ионов ртути – в пробах воды.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания.

1. Учитывая разные формы градуировочных кривых в конкурентном и сэндвич-ИФА и, соответственно, разные критерии оценки минимальных определяемых концентраций, можно ли считать оптимальные составы субстратных смесей для конкурентного и сэндвич-ИФА с усиленной хемилюминесценцией априорно совпадающими? Комментарий по этому вопросу был бы полезен при интерпретации результатов разработки ИФА метилглиоксаль-модифицированных липопроотеинов низкой плотности (МГ-ЛНП).

2. Диссертант оценивает предлагаемый в работе метод определения МГ-ЛНП как высокочувствительный, перспективный при диагностике атеросклероза (стр. 75-76 диссертации). Это утверждение отражает отличия двух калибровочных кривых, представленных на рис. 33 (хотя дополнительное количественное сопоставление их аналитических параметров было бы полезно). Однако для обоснования постулируемой практической востребованности разработки имело бы смысл рассмотреть уровни МГ-ЛНП в норме и при патологиях, аналитические возможности альтернативных методов (прежде всего коммерческих диагностикумов).

3. В диссертации рассматривается определение специфических фрагментов ДНК на основании образования ими комплексов в стандартных микропланшетах. Данный подход интересен простотой реализации, однако на сегодняшний день куда менее охарактеризован по сравнению с микропланшетными видами ИФА. Так, неясно, насколько эффективно проходят гибридизационные процессы вблизи поверхности микропланшета, оправдано ли при проведении анализа использование априорно выбранных длительностей специфических взаимодействий. Комментарий о кинетике и условиях гетерогенного гибридизационного комплексообразования между нуклеиновыми кислотами был бы полезен. Неясно, почему в рамках диссертации не рассматривается возможность образования специфических комплексов в растворе (в отсутствие

диффузионных ограничений) с последующей их аффинной фиксацией на носителе для отмывки и детекции.

4. Диссертант резонно отмечает, что квадруплексная структура аптамеров часто стабилизируется теми или иными катионами. С учетом этого остается неясным, можно ли считать выбранные условия применения ппДНКзима (стр. 84) абсолютно оптимальными. Также не пояснено, на чем был основан выбор концентраций компонентов, не варьировавшихся в представленных экспериментах, – например, ДМСО и детергента.

5. При аптамерном определении ионов ртути было бы интересно рассмотрение селективности аналитической системы по отношению к таким часто встречающимся контаминантам, как ионы железа и меди. Как соотносится достигнутая чувствительность с параметрами альтернативных разработок и с требованиями к контролируемым уровням контаминации природных вод?

Вышеизложенные соображения носят частный и дискуссионный характер, не снижают общую положительную оценку работы и не влияют на обоснованность положений диссертации, выносимых на защиту.

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 7 статей в научных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ 02.08 по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии). Среди этих журналов – такие ведущие профильные издания, как *Talanta* (первая квартиль JCR и SJR), *RSC Advances* (первая квартиль SJR). Кроме того, опубликованы тезисы 7 докладов на всероссийских и международных научных конференциях. Все полученные результаты, установленные закономерности и выводы, выносимые на защиту, представлены в публикациях соискателя. Автореферат в полной мере отражает результаты проведенного исследования и их интерпретацию.

Работа Анастасии Владимировны Грибас «Хемилюминесцентные иммуно- и олигонуклеотидные методы анализа с применением пероксидазы и пероксидаза-подобного ДНКзима» по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов является законченным самостоятельным исследованием высокого теоретического и экспериментального уровня. Соискателем выполнена научно-квалификационная работа, в которой содержится решение задачи, значимой для развития биотехнологии, – предложен и охарактеризован ряд взаимодополняющих подходов, обеспечивающих высокочувствительную детекцию селективных лиганд-рецепторных комплексов на основании регистрации каталитической активности пероксидазы и ее миметиков.

диффузионных ограничений) с последующей их аффинной фиксацией на носителе для отмывки и детекции.

4. Диссертант резонно отмечает, что квадруплексная структура аптамеров часто стабилизируется теми или иными катионами. С учетом этого остается неясным, можно ли считать выбранные условия применения ппДНКзима (стр. 84) абсолютно оптимальными. Также не пояснено, на чем был основан выбор концентраций компонентов, не варьировавшихся в представленных экспериментах, – например, ДМСО и детергента.

5. При аптамерном определении ионов ртути было бы интересно рассмотрение селективности аналитической системы по отношению к таким часто встречающимся контаминантам, как ионы железа и меди. Как соотносится достигнутая чувствительность с параметрами альтернативных разработок и с требованиями к контролируемым уровням контаминации природных вод?

Вышеизложенные соображения носят частный и дискуссионный характер, не снижают общую положительную оценку работы и не влияют на обоснованность положений диссертации, выносимых на защиту.

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 7 статей в научных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ 02.08 по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии). Среди этих журналов – такие ведущие профильные издания, как *Talanta* (первая квартиль JCR и SJR), *RSC Advances* (первая квартиль SJR). Кроме того, опубликованы тезисы 7 докладов на всероссийских и международных научных конференциях. Все полученные результаты, установленные закономерности и выводы, выносимые на защиту, представлены в публикациях соискателя. Автореферат в полной мере отражает результаты проведенного исследования и их интерпретацию.

Работа Анастасии Владимировны Грибас «Хемилюминесцентные иммуно- и олигонуклеотидные методы анализа с применением пероксидазы и пероксидаза-подобного ДНКзима» по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов является законченным самостоятельным исследованием высокого теоретического и экспериментального уровня. Соискателем выполнена научно-квалификационная работа, в которой содержится решение задачи, значимой для развития биотехнологии, – предложен и охарактеризован ряд взаимодополняющих подходов, обеспечивающих высокочувствительную детекцию селективных лиганд-рецепторных комплексов на основании регистрации каталитической активности пероксидазы и ее миметиков.

Диссертационная работа А.В. Грибас в полной мере соответствует паспорту специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) (химические науки) и удовлетворяет критериям, устанавливаемым пп. 2.1-2.5 «Положения о присуждении учёных степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова». Диссертация и автореферат А.В. Грибас оформлены согласно Приложениям №№ 5, 6 к «Положению о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова».

Исходя из вышеизложенного, А.В. Грибас, автор диссертационной работы «Хемилюминесцентные иммуно- и олигонуклеотидные методы анализа с применением пероксидазы и пероксидаза-подобного ДНКзима», несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиохимии
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН),
кандидат биологических наук

Жердев Анатолий Виталиевич

14 сентября 2018 г.

Почтовый адрес: ФИЦ Биотехнологии РАН, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2,
119071, Москва, Россия. Жердеву А.В.
Телефон (495)-9542804. Адрес электронной почты zherdev@inbi.ras.ru

«Подпись к.б.н. Жердева А.В. удостоверяю»

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН

к.б.н. Орловский А.Ф.

