

**ОТЗЫВ официального оппонента**  
**на диссертацию на соискание ученой степени**  
**кандидата химических наук Нечаевой Натальи Леонидовны**  
**на тему: «Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния**  
**с использованием наноструктур серебра для определения белков-**  
**маркеров и ферментов» по специальности 03.01.06 —«биотехнология**  
**(в том числе бионанотехнологии)»**

Ключевой тенденцией в развитии биоаналитических систем последних лет является разработка и внедрение в практику подходов, направленных на снижение предела обнаружения. Новые знания о биомаркерах дисфункций и патологий, получаемые с использованием высокопроизводительных омиксных технологий, а также переход к малоинвазивным и неинвазивным методам отбора проб обуславливает необходимость выявления существенно более низких концентрацией диагностически значимых соединений, чем это возможно с использованием таких стандартных на сегодняшний день методов, как иммуноферментный анализ. В ряду перспективных подходов к высокочувствительной диагностике особый интерес вызывают решения, связанные с регистрацией гигантского комбинационного рассеяния (ГКР). Теоретические оценки разных форматов проведения ГКР-анализа позволяют ожидать снижения с его помощью пределов выявления аналитов на много порядков по сравнению с традиционной спектрофотометрией. Однако эффективная реализация потенциала ГКР возможна только при выборе оптимальных наноструктурированных подложек и их сочетаний с соответствующими генерирующими сигнал репортерными молекулами. Известные на сегодняшний день разработки биоаналитических систем, основанных на регистрации ГКР, демонстрируют значительный разброс в чувствительности, а причины такой вариабельности остаются невыясненными. Наблюдающееся в последние годы развитие методов

получения наноматериалов разного состава и структуры, а также инструментальных методов их характеристики позволяет доказательно сравнивать разные форматы ГКР-анализа и выбирать решения с максимальным уровнем сигнала и высокой воспроизводимостью. Выявление новых перспективных наноструктурированных подложек для ГКР-анализа становится не только востребованным, но и возможным, что и определяет **актуальность темы** исследования, проведенного в диссертационной работе Н.Л. Нечаевой, – изучения использования наноструктурированных субстратов серебра для определения белков-маркеров и активности ферментов методом спектроскопии ГКР.

Подготовленные соискателем диссертация и автореферат, а также публикации по теме диссертационной работы свидетельствуют о достижении поставленной цели и успешном решении всех необходимых для этого задач. В работе представлена подробная характеристика ГКР-подложек на основе мультиразмерных пластин серебра, их структурное изучение комплексом взаимодополняющих методов и теоретическое описание свойств как ГКР-усилителей. С использованием данных носителей реализованы аналитические системы для определения гликированного альбумина, тиохолина и измерения бутирилхолинэстеразной активности. Показана высокая точность и достоверность результатов, получаемых с использованием предлагаемых методов, их конкурентный потенциал по сравнению с существующими аналитическими методами. По результатам проведенного исследования опубликовано 5 статей в рецензируемых международных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus (включая такие ведущие первоквартильные издания в области биоаналитической химии, как *Sensors and Actuators: B. Chemical* и *Analytica Chimica Acta*), 2 статьи в спецвыпусках с трудами конференций, 2 главы в сборниках и 11 тезисов докладов российских и международных конференций. Результаты разработки последовательно изложены в подготовленной диссертации,

демонстрирующей методическую корректность экспериментов, статистическую достоверность заключений на основании полученных результатов, учет современного уровня разработок при оценке возможностей предлагаемых решений. Таким образом, материалы диссертации и вышедшие публикации однозначно подтверждают **обоснованность, достоверность и новизну научных положений, выводов и рекомендаций**, выносимых на защиту.

Подготовленная диссертационная работа свидетельствует о высокой квалификации соискателя. В обзоре литературы собраны и систематизированы данные, отражающие современный уровень разработок по теме диссертационного исследования. Представленный анализ литературы дает возможность убедительно обосновать выбор решаемых задач и используемых методов, аргументированно оценить новизну и значимость результатов проведенных исследований. Методики, представленные в разделе «Экспериментальная часть», корректно выбраны и позволяют получать достоверную, однозначно интерпретируемую информацию. Освоение данных методик свидетельствует о высокой экспериментальной квалификации Н.Л. Нечаевой, ее способности ориентироваться в современных биотехнологических подходах. Материал в разделе «Результаты и их обсуждение» четко изложен и корректно структурирован, полностью логичен. Особо следует отметить тщательность математической обработки получаемых результатов, обоснованный учет факторов, влияющих на характеристики разрабатываемых аналитических систем. Предложенные в результате исследования методы детально охарактеризованы, убедительно показано успешное обеспечение высокочувствительного ГКР-анализа.

Научная новизна проведенного исследования определяется изучением подложек на основе мультиразмерных пластин серебра с дополнительным покрытием наночастицами серебра и без покрытия в качестве ГКР-активных субстратов. Показано, что модификация

предложенных серебряных ГКР-подложек 4-меркаптофенилбороновой кислотой обеспечивает последующую высокую селективность выявления диол-содержащих соединений. Подтвержденные преимущества этих субстратов позволили реализовать с их помощью высокочувствительное выявление ферментов и белков-маркеров, сохраняющее эффективность при переходе к мультикомпонентным биопробам (проведению анализов в плазме крови человека).

Практическая значимость диссертационной работы связана с расширением возможностей высокочувствительного выявления ряда диагностически значимых аналитов, в частности, соединений, отражающих эффективность защиты организма от действия токсикантов, а также оценки уровня гликирования белков крови, отражающего состояние углеводного обмена и риски развития диабета и других распространенных заболеваний.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания.

1. Диссертант отмечает (стр. 44) возможности значительного усиления ГКР-сигнала при формировании на подложке хлопьевидных структур из нанопластин серебра. Однако такое покрытие, очевидно, нестабильно. Как лучше всего хранить предлагаемые структуры? В течение какого времени после изготовления они могут быть использованы без ухудшения аналитических характеристики? (Приводимые далее, на стр. 60, сведения относятся лишь к одному из вариантов подложек и не дают однозначной информации о начале значимых изменений.)

2. Данные СЭМ демонстрируют неупорядоченное многослойное расположение серебряных нанопластин на подложке. В этой связи применимость рекомендаций, следующих из теоретического моделирования, требует дополнительного пояснения. Как практически изменять рассматриваемые в модели радиусы серебряных пластин и расстояния между ними?

3. Расчеты предела обнаружения при определении тиохолина используют значение стандартного отклонения нулевого измерения. Однако данная величина при изложении результатов (стр. 62) не приводится, а на рис. 30 интервал стандартного отклонения визуально неразличим. К тому же минимальная концентрация тиохолина, использовавшаяся при построении градуировочной зависимости, в несколько раз больше расчетных пределов обнаружений. Было бы полезно рассмотреть определение малых (0,3 – 5 мкМ) концентраций тиохолина более подробно.

4. Градуировочные зависимости, полученные при проведении экспериментов по трансформации бутирилтиохолина в тиохолин в буфере и в плазме крови, отличаются. Однако в тексте диссертации дается комментарий (стр. 66): «При этом матрикс не влияет на результаты эксперимента». Что имеется в виду под результатами эксперимента в данном случае? Неясно также, насколько выражены вариации результатов при работе с пробами плазмы от разных доноров.

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

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

Таким образом, соискатель Нечаева Наталья Леонидовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)».

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

«03» июня 2021 г.

Контактные данные: тел.: (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.  
Федеральное государственное учреждение «Федеральный  
исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), отдел лиганд-  
рецепторных взаимодействий и биосенсорики  
тел.: (495)954-31-42., e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

*Подпись сотрудника ФИЦ Биотехнологии РАН  
Б.Б. Дзантиева удостоверяю*

Зав. канцелярией ФИЦ Биотехнологии РАН  
Л.А. Мажорова

«03» июня 2021 г.

М.П.