

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу
САФРОНОВОЙ Валентины Андреевны «Экспресс-методы иммуноанализа
прогестерона в молоке для целей ветеринарной диагностики»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»**

В последние годы активно развиваются методы экспрессного выявления и оценки содержания биологически активных соединений, основанные на быстром проведении биоспецифических взаимодействий в автономных тест-системах. Благодаря возможности оперативного получения результатов тестирования непосредственно на месте отбора пробы, данные методы все более широко применяются для решения разнообразных задач медицинской и ветеринарной диагностики, экологического мониторинга, обеспечения биобезопасности, контроля качества продуктов питания и другой потребительской продукции. Возможности таких систем во многом зависят от выбора формата проведения анализа, порядка, в котором реализуются специфические взаимодействия, детектируемой метки и способа ее регистрации. Несмотря на большое число публикаций, посвященных характеристике новых методических решений для экспрессных биоаналитических тест-систем, вопросы выбора наиболее эффективных маркеров и форматов анализа продолжают оставаться открытыми; исследователи ограничиваются попарными сравнениями предлагаемых и традиционных систем детекции определенного аналита, результаты которых далеко не всегда могут быть перенесены на другие объекты.

С учетом вышеизложенного, бесспорной является актуальность диссертационной работы В.А. Сафроновой, в которой проведена детальная характеристика мембранных иммунохимических тест-систем продольного и поперечного потока, реализуемых с использованием различных маркеров. Исследование выполнено на примере иммуноанализа прогестерона в молоке. Контроль данного соединения как биомаркера беременности имеет важное значение для животноводства, что определяет практическую востребованность разработки.

Подготовленная В.А. Сафроновой диссертация отражает успешное достижение поставленной цели – разработку быстрых тест-систем для количественного и полуколичественного иммунохимического определения прогестерона в цельном молоке коров для раннего выявления стельности. Диссертационная работа построена по традиционной схеме. Она состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (глава 2), результатов и обсуждения (глава 3), выводов, списка

литературы. Работа изложена на 139 страницах, содержит 12 таблиц и 67 рисунков. В библиографии диссертации представлен 201 источник.

Во вводной части диссертации кратко описываются основные способы экспрессной иммунодиагностики, используемые в современной практике, а также состояние разработок по определению уровня прогестерона для диагностики стельности крупного рогатого скота. Подготовленный В.А. Сафроновой литературный обзор вводит все понятия, необходимые при дальнейшем рассмотрении экспериментальных результатов диссертанта. Подробно охарактеризованы латеральный проточный иммуноанализ и иммунофльтрационный анализ. Убедительно сформулированы и обоснованы требования, которые предъявляются к компонентам тест-систем, относящихся к этим двум классам. Детально описаны мембранные компоненты тест-систем, особенности мембранных носителей, связанные с их использованием для решения тех или иных задач. Рассмотрены различные форматы проведения иммуноанализа, отличающиеся по составу и порядку формирования детектируемых иммунных комплексов. Для иммунохроматографических систем приведена информация о существующих разработках по математическому моделированию иммунохимических процессов в тест-системах, возможностях практического применения установленных закономерностей. Охарактеризованы различные иммуноаналитические метки, их сравнительные преимущества и ограничения применения. Далее диссертант переходит к рассмотрению целевого анализата. Описана физиологическая роль прогестерона, дается оценка применяемых на данный момент методов его иммунодетекции, включая радиоиммунологический анализ, иммуноферментный анализ, флуоресцентный иммуноанализ, биосенсорный анализ, коммерческие мембранные экспресс-тесты.

В целом литературный обзор обеспечивает основу, необходимую для дальнейшего изложения и обсуждения результатов. Анализ литературы проведен на высоком уровне и дает адекватное представление о современных разработках. Материал хорошо структурирован и четко изложен, все авторские комментарии и обобщения логично обоснованы. Приведенные в обзоре сведения позволяют содержательно интерпретировать получаемые диссертантом данные, оценивать их значимость и новизну. В целом литературный обзор свидетельствует о высокой квалификации В.А. Сафроновой в области биотехнологии (в том числе бионанотехнологии).

Отметим, что при обсуждении получения нанодисперсного золота методом цитратного восстановления (стр. 26 диссертации) диссертант в основном ориентируется на классические работы Френса и Туркевича, заложившие основы этого подхода. В последние годы опубликован ряд принципиальных работ, расширяющих представления о механизмах этого процесса, его стадийности, возможностях управления свойствами получаемого

продукта (DOI: 10.1021/acsnano.5b01579; 10.1021/acs.langmuir.5b02759; 10.1039/C5CE01014D; 10.1016/j.jcis.2016.10.065; 10.1021/jp401883h; 10.1021/ja074447k; 10.1021/acs.langmuir.6b01312). Обсуждение этих статей было бы полезным для более подробной характеристики доступного исследователям инструментария и возможностей его применения в рамках той или иной решаемой задачи. Впрочем, анализ, представленный в литературном обзоре, вполне корректно и успешно применен диссертантом для интерпретации собственных результатов.

В главе «Экспериментальная часть» представлен инструментарий, использованный В.А. Сафроновой при проведении исследования. Этот ряд методов включает получение конъюгатов производного прогестерона с белковыми носителями и дальнейшее их конъюгирование с нанодисперсным золотом, изготовление мультимембранных композитов, проведение иммунохроматографического анализа с нанодисперсной и с ферментной метками, проведение иммунофильтрационного анализа, подготовку к анализу проб молока, проведение микропланшетного иммуноферментного анализа, обработку получаемых результатов. Данный ряд методов полностью соответствует поставленным в диссертационной работе задачам, отражает современный уровень биотехнологических исследований, дает возможность получать наиболее информативные результаты. Все методики подробно и однозначно описаны, что обеспечивает возможность их воспроизведения и корректность интерпретации экспериментальных данных.

В разделе «Результаты и обсуждение» представлены логично структурированные серии опытов, посвященных разработке и характеристике различных видов быстрых иммунохимических тестов для детекции прогестерона. Для латерального проточного иммуноанализа с нанодисперсной и ферментной метками, равно как и для иммунофильтрационного анализа проведен необходимый комплекс экспериментов, начинающийся с получения и характеристики необходимых для анализа реагентов и завершающийся оценкой практической применимости разработанных систем. Отметим, что диссертант не ограничивается общепринятыми форматами анализа. С целью обеспечения наиболее высокочувствительной детекции прогестерона ей сопоставляются варианты иммунохроматографии, различающиеся по выбору реагентов, иммобилизуемых в тестовой зоне и на поверхности нанодисперсного носителя; обсуждаются различные варианты применения пероксидазной метки в качестве альтернативы золотых наночастиц.

Диссертантом созданы простые тест-системы для количественного и полуколичественного определения прогестерона в цельном молоке коров. Предложенные тесты были использованы в молочных хозяйствах для раннего определения стельности коров; подтверждена их диагностическая эффективность.

В результате выполненного исследования В.А. Сафроновой не только предложены новые биоаналитические системы, имеющие большой потенциал дальнейшего практического применения, но и установлен ряд важных закономерностей, общих для биотехнологии получения иммуноаналитических тестов и потенциально применимых при разработке новых средств детекции других практически востребованных соединений. Так, диссертантом разработаны условия регистрации ферментной метки в латеральных проточных иммуноаналитических системах, обеспечивающие высокую чувствительность детекции и воспроизводимость результатов. Исследована стабильность пероксидазы при разных режимах нанесения ее конъюгатов на иммунохроматографические носители. Изучено влияние структуры и компоновки мембранных компонентов на характеристики анализа. Охарактеризована динамика формирования детектируемых комплексов.

Значимость для науки и производства полученных данных и установленных закономерностей определяется как созданием прототипных тест-систем для масштабируемых технологий их производства, так и выявлением общих закономерностей функционирования мембранных иммунохимических экспресс-тестов. Несомненна целесообразность дальнейшего развития подходов к проведению латерального проточного иммуноанализа и иммунохроматографического анализа, предложенных в диссертационной работе В.А. Сафроновой.

Материалы исследования логично и последовательно изложены в подготовленной диссертации и ее автореферате. Используемые в работе средства компьютерной обработки изображений тест-систем обеспечивают объективность заключений и достоверность обсуждаемых количественных характеристик. Описываемые эффекты и закономерности подтверждены корректно спланированными контрольными экспериментами. Формулируемые выводы обоснованы, логично вытекают из полученных данных, полностью соответствуют целям и задачам исследования. Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнения.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания.

1. Как показано в ряде недавних работ, количество функционально активных иммунореагентов, находящихся на поверхности золотой наночастицы, может радикально влиять на рабочий диапазон иммунохроматографического анализа. В связи с этим спорным представляется решение о выборе соотношения наночастиц золота и иммобилизуемого на них конъюгата прогестерона, основанном исключительно на определении по флоккуляционной зависимости концентрации конъюгата, стабилизирующей суспензию коллоида. Стабилизация суспензии может быть проведена

и на последующих стадиях. Сравнение иммунореактивности и аналитических параметров, установленных для конъюгатов золотых наночастиц с разной нагрузкой антигенных групп, было бы полезно.

2. Для пробоподготовки молока диссертант предлагает (см. стр. 63 диссертации) проводить 30-минутную прединкубацию проб при 37 °С. Учитывая, что реализация последующего иммуноанализа требует не более чем 20 мин, такая пробоподготовка существенно увеличивает время, необходимое для получения результата тестирования. В связи с этим принятое решение желательно сопроводить комментариями – какие задачи решает предлагаемая пробоподготовка, возможно ли сокращение ее продолжительности без ухудшения аналитических характеристик тест-системы?
3. Из обсуждения полученных результатов остается неясно, как диссертант объясняет причины меньшей полноты выявления прогестерона в иммунофильтрации по сравнению с иммунохроматографией. Почему добавление метанола для извлечения прогестерона из жировой фракции молока требуется для иммунофильтрационного анализа, тогда как иммунохроматографический анализ может быть проведен без этой стадии? Имеет смысл также объяснить, почему в качестве экстрагирующего органического растворителя в работе предлагается использовать токсичный метанол.

Вышеизложенные соображения имеют частный характер, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту диссертации, и не снижают ее общую положительную оценку.

Результаты проведенных исследований представлены научному сообществу на одиннадцати научных мероприятиях всероссийского и международного уровня. Основные положения и выводы работы представлены в 14 публикациях, в том числе в двух статьях в журналах, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в базах данных «Web of Science» и «Scopus». В виде публикаций и докладов представлены все результаты диссертации. Содержание работы в полной мере соответствует специальности 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)». Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертационной работы, полно и адекватно отражает результаты выполненного исследования.

В.А. Сафроновой выполнена научно-квалификационная работа, в которой, в соответствии с требованиями п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемыми к кандидатским диссертациям, содержится решение задачи, имеющей существенное значение для развития биотехнологии (в том числе бионанотехнологии): на примере иммуноанализа прогестерона разработаны и апробированы эффективные форматы проведения латерального проточного иммуноанализа и иммунофильтрационного анализа.

Диссертация В.А. Сафроновой «Экспресс-методы иммуноанализа прогестерона в молоке для целей ветеринарной диагностики» по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов является законченной работой высокого теоретического и экспериментального уровня. Диссертационная работа В.А. Сафроновой полностью соответствует требованиям, устанавливаемым «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, в редакции Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)».

Доктор химических наук, профессор

Б.Б. Дзантиев

« 23 » ноября 2016 г.

Заместитель директора по науке,
заведующий лабораторией иммунобиохимии
ФИЦ Биотехнологии РАН.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), Институт биохимии им. А.Н. Баха, лаборатория иммунобиохимии.
Почтовый адрес: ФИЦ Биотехнологии РАН, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, 119071, Москва, Россия
Телефон: (495)954-31-42.
Адрес электронной почты: dzantiev@inbi.ras.ru

Подпись руки Б.Б. Дзантиева заверяю:

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН,
канд. биол. наук



А.Ф. Орловский

« 23 » ноября 2016 г.