

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Зыбина Дмитрия Игоревича «Молекулярно-диагностические наборы на основе полианилинсодержащих композитов для одностадийной экстракции нуклеиновых кислот» на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.2. Аналитическая химия (химические науки)

Актуальность исследования. Выделение и характеристика биополимеров для их последующего использования в различных отраслях науки и техники является важным направлением развития биотехнологий и биоанализа в целом. Нуклеиновые кислоты востребованы в молекулярно-диагностических тест-системах, в качестве элементов биораспознавания в ДНК-чипах, рассматриваются как перспективные элементы компьютерной памяти и других компонентов биокомпьютеров. Также следует отметить использование олигонуклеотидов для лечения врожденных дефектов и в качестве носителей для доставки противораковых препаратов в клетки. Актуальна задача совершенствования существующих и развития новых подходов к выделению и очистке нуклеиновых кислот с учетом особенностей их биологической матрицы, строения, молекулярной массы и других факторов, определяющих их применение в медицине, биоанализе и фармацевтике. В этой связи цель представленной диссертации, связанная с развитием методологии скрининга полимерных модификаторов для отрицательной селекции сорбируемых компонентов по отношению к нуклеиновым кислотам, а также апробацией полученных результатов в создании молекулярно-диагностических наборов, представляется *актуальной, научно и практически значимой*.

Для достижения указанной цели Д.И.Зыбин сформулировал и последовательно решил задачи, включающие направленный выбор полимерных сорбентов, проявляющих эффект негативной селекции по отношению к нуклеиновым кислотам, исследовал морфологию поверхности и сорбционные свойства полученных сорбентов, разработал новые подходы к методологии экспресс-скрининга свойств полимеров и предложил протоколы полного цикла производства молекулярно-диагностических наборов, локализованный на территории Российской Федерации.

Диссертация изложена на 136 страницах машинной вёрстки, содержит 20 таблиц, 37 рисунков, приложение на 13 страницах. Список использованных библиографических источников включает 93 описания работ отечественных и зарубежных авторов.

Работа имеет классическое построение и состоит из Введения, трех глав, заключения, выводов и приложений.

Введение включает обоснование актуальности работы, описание степени проработанности темы, цель и задачи проведенного исследования, положения, составляющие научную новизну и практическую значимость, а также положения, выносимые на защиту. Дана краткая характеристика структуры диссертации и обоснование ее соответствие паспорту специальности «Аналитическая химия». Определен личный вклад автора, состоящий в проведении эксперимента, обобщении полученных результатов, написании публикаций по теме диссертации и практическом внедрении результатов исследования.

Глава 1. «Литературный обзор» посвящена описанию современных методов выделения и очистки нуклеиновых кислот и белков с использованием коммерческих наборов. Также приводятся основы методов их разделения и очистки, основанных на различных вариантах хроматографии, и инструментальные методы исследования свойств полимерсодержащих сорбентов (зондовая микроскопия и спектральная корреляционная интерферометрия). В этом же ряду приводится полимеразная цепная реакция, что представляется не совсем логичным, поскольку это метод амплификации нуклеиновых кислот, а не их очистки и разделения. Характеризуя обзор в целом, необходимо отметить, что он содержит информацию, необходимую для последующей оценки проведенных экспериментов, но не альтернативные методы, которые могли бы составить конкуренцию разработанным автором подходам. Также хотелось бы видеть описание сорбентов, содержащих полианилин и фторполимеры, раз уж автор декларировал их синтез и использование в рамках научной группы до работ по тематике диссертации.

Глава 2. «Экспериментальная часть» содержит описание синтеза использованных в работе композитных сорбентов, протоколы выделения ДНК из различных объектов контроля. Приводятся примеры расчетов концентрации ДНК по калибровочным растворам и реагентов для ПЦР. Возможно, следовало уделить больше внимания

характеристике исходных реагентов (чистота, производитель) и методам контроля эффективности (успешности) модификации кремнеземов фторполимером (он приводится в следующей главе без описания, торговая марка – только на стр.63) и полианилином. Отсутствует характеристика растворов для лизиса бактерий, буфера для разведения, растворов для экстракции нуклеиновых кислот. Описание содержит достаточно много сокращений, которые не объяснены (часть из них отсутствует и в списке сокращений в конце диссертации). Пропись синтеза полианилина не содержит прямого упоминания о добавлении окислителя, то, что ПСА значит персульфат аммония, мы узнаем на стр.62. Нет концентрации соляной кислоты, важного параметра в полимеризации анилина.

Глава 3. «Результаты и обсуждение» содержит собственные экспериментальные результаты, полученные диссертантом. Первой частью исследования была разработка методологии скрининга сорбционных свойств полимеров для негативной селекции нуклеиновых кислот. Для этого предлагается использовать зондовую микроскопию, спектрофотометрию и электрофорез. Проведена оценка эффективности удерживания ДНК и белков с различным значением pI и сделан вывод о варьирования негативной селекции (удерживания белка) при изменении молекулярной массы и заряда глобулы белка в зависимости от природы модификатора кремнезема. Аналогичные исследования проведены с помощью спектральной корреляционной интерферометрии в режиме динамической адсорбции – десорбции. В отличие от спектрофотометрии и электрофореза, в данном методе в качестве фактора, влияющего на разделение белков и нуклеиновых кислот, рассматривается гидрофильно-гидрофобный баланс (на примере альбумина). Вывод о возможности комплексной оценки сорбционных свойств носителей по совокупности приведенных в разделе экспериментов обобщен в виде удобной схемы.

На следующем этапе проведена оценка влияния условий синтеза полианилина на эффективность использования модифицированных сорбентов в разделении ДНК и белков. Варьирование концентрации и соотношения реагентов позволило установить рабочие параметры синтеза. Новизна предложенного подхода состояла в предварительной адсорбции мономера на частицах кремнезема, так что полианилин накапливался исключительно в составе частиц носителя. Это исключило стадию удаления избытка полимера и позволило унифицировать параметры образующегося покрытия.

Основной вывод, сделанный на основе сравнения результатов сорбции белков и разделения продуктов ПЦР и белков, состоит в близости параметров сорбентов на основе нового процесса полимеризации анилина и применения в качестве подложки фторполимерной пленки.

Практическое использование полученных результатов продемонстрировано путем разработки протоколов выделения ДНК из реальных образцов объектов контроля (зерно, грибы *Fusarium graminearum*, почвенные бактерии). В последнем случае особое внимание было уделено удалению ингибиторов ПЦР (гуминовые вещества). Для их удаления предложено сочетание полиальгинатного геля и полианилин-содержащих сорбентов как основы для удаления белков. Для оценки эффективности предложенных протоколов использовали коммерческие наборы для выделения ДНК. На основании полученных результатов разработан набор для экстракции суммарной ДНК из образцов почвы. Аналогичные эксперименты были проведены для фармацевтической субстанции Инфликсимаб, где определяли присутствие ДНК штамма-продуцента. Для ДНК СНО приведен протокол метрологической характеристики методики определения остаточных количеств в соответствии с требованиями Фармакопеи.

Заключение и выводы обобщают полученные результаты, они логичны и соответствуют полученным экспериментальным результатам и уровню из обсуждения.

Характеризуя диссертацию Зыбина Д.И. в целом, следует отметить, что это целостное законченное исследование, в котором получены новые данные, связанные с возможностями использования негативной селекции для очистки и последующего ПЦР-определения ДНК из различных источников. К *научной новизне* проведенного исследования относятся:

- Выявление факторов, влияющих на сорбцию белков в статическом и динамическом эксперименте;
- Определение способов улучшения характеристик сорбентов на основе кремнеземов и различных модификаторов, для полианилина,
- Оригинальная методика технологичного синтеза тонкой пленки полианилина с предварительной сорбцией мономера;
- новые подходы к выделению, очистке и количественному определению ДНК из различных источников с учетом особенностей матрицы, присутствия ингибиторов ПЦР и возможной кросс-селективности сигнала от компонентов пробы.

Работа обладает несомненным *прикладным значением*. В ней показано, что использование совокупности предложенных приемов проведения синтеза и проведения сорбционной очистки позволяют достичь результатов, сопоставимых с достигаемыми при использовании импортных коммерческих наборов и тестов, проведена валидация методики ДНК-анализа фармацевтической субстанции, предложены новые формы сорбентов, в том числе, композитных и сочетающих несколько вариантов подложки (полиальгинатную и кремнеземную) для обеспечения одностадийности протокола очистки.

Вместе с тем, к работе имеется ряд замечаний:

1. Утверждения о комплексном подходе и методологии решений не следуют из объема представленного эксперимента. Говорить об оптимизации синтеза по результатам трех различных наборов трех независимых параметров (концентрации анилина, соляной кислоты и объем соляной кислоты) не приходится, то же относится к оценке влияния природы модификатора – нет данных о возможном влиянии поверхностной концентрации модификатора, способа нанесения, представлены единичные эксперименты исследования морфологии пленок с помощью зондовой микроскопии и др. В лучшем случае речь идет о проверке определенных гипотез, связанных с влиянием тех или иных факторов, но не об оптимизации протоколов в целом.
2. Соискатель трактует данные зондовой микроскопии в терминах сплошности, толщины и рельефа поверхностного слоя. Однако представленные данные не содержат информации об указанных параметрах – приведены только трехмерные модели и рельефы, которые отражают перепад высот (не обозначено, где), но не толщину сплошного слоя. Также отсутствует статистический анализ элементов рельефа (пор по диаметру, элементов рельефа по размерам) – для этого обычно приводят гистограммы, показывающие долю соответствующих элементов покрытия в процентах.
3. Говоря о динамической адсорбции, автор рассматривает влияние pH исключительно в плане изменения заряда поверхности белка, тогда как необходимо также иметь ввиду процессы протонирования макромолекул полианилина.
4. Автор приводит графики, взятые из интерфейса ПЦР амплификатора, которые, в общем-то, повторяют друг друга и не несут информации, то же касается температурных профилей ПЦР, это представляется излишним.

5. Работа неудачно структурирована, в ней детали эксперимента представлены не в главе 2, для этого предназначенной, а по тексту главы 3, что затрудняет рассмотрение работы в целом. Хаотично разбросаны сокращения и их объяснения, введенные акронимы не используются, а другие сделаны на английском и русском языке (ПАНИ и PANI, относительное стандартное отклонение и s.d., PBS и фосфатно-солевой буфер). Неудачный выбор – использование Excel. Есть целый ряд неудачных выражений - стр.54 «... элюаты, содержащие наряду с трифторметильными также электроноакцепторные группы», стр. 62 – «нанотолщинные полимерные покрытия». Подписи к рисункам не всегда информативны. В заголовках столбцов таблиц встречаются ссылки на отсутствие примечания.

Указанные замечания в основном носят технический характер и не меняют общей положительной оценки работы. Ее содержание полностью отражено в автореферате и основных публикациях. Имеется пять статей в журналах, рекомендованных ВАК, включая высокорейтинговые международные Microchem. J., Colloids Surf. B.

Общее заключение. Диссертация соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Это законченная научно-квалификационная работа, совокупность положений которой можно оценить как решение задачи совершенствования методов очистки ДНК для биоанализа. Ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.2. Аналитическая химия (химические науки).

Официальный оппонент

Заведующий кафедрой аналитической химии

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет

Доктор химических наук (02.00.02 – аналитическая химия),

профессор

19.05.2023

Почтовый адрес: 420008, г. Казань

Ул. Кремлевская, 18,

Тел. +7 843 2337491

email: Gennady.Evtugyn@kpfu.ru

Евтюгин Геннадий Артурович

