

## О Т З Ы В

официального оппонента доктора химических наук профессора  
Шеховцовой Татьяны Николаевны на диссертационную работу  
ТАРАНОВОЙ Надежды Алексеевны

на тему «Комплексы антител с нанодисперсными носителями: синтез, свойства и применение в иммунохроматографии», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия

Возросший в последние годы в разных странах интерес к получению и изучению наночастиц различной химической природы свидетельствует о перспективности их применения во многих областях химии и биологии, в частности в качестве реагентов в биохимических исследованиях и химическом анализе. Этот интерес объясняется такими замечательными свойствами наночастиц, как большая удельная поверхность, оптические, электрические, магнитные и другие свойства, а также зависимостью свойств наночастиц от их размеров, что обуславливает возможность одновременного быстрого, селективного, высокочувствительного обнаружения и определения нескольких соединений.

Для расширения круга получаемых препаратов наночастиц и повышения эффективности их применения в биохимических исследованиях, создания новых биоаналитических систем необходимо продолжать и интенсифицировать изучение и оптимизацию свойств самих наночастиц, состава и свойств их конъюгатов с биомолекулами, обеспечивающих наибольшую чувствительность определения различных соединений. В связи с вышесказанным исследование, проведенное Н.А. Тарановой и направленное на *изучение свойств комплексов антител с нанодисперсными маркерами разной природы и применение полученных реагентов для разработки новых иммунохроматографических тест-систем* представляется **весьма актуальным**.

Для достижения поставленной цели автором были решены следующие задачи:

- изучены и охарактеризованы размеры и оптические свойства конъюгатов антител с полупроводниковыми квантовыми точками (ядро CdSe / оболочка ZnS); показано сохранение таких конъюгатами разного размера высокой - от 70 до 97% интенсивности флуоресценции;
- определены и сопоставлены кинетические и равновесные константы комплексообразования с антигеном – антибиотиком хлорамфениколом, свободных антител и антител в составе конъюгатов с квантовыми точками;
- изучены закономерности взаимодействия иммунореагентов, меченных нанодисперсными маркерами (квантовыми точками и коллоидным золотом), в иммунохроматографических тест-системах с фото- и флуориметрической детекцией и сопоставлены аналитические характеристики этих тест-систем: показано, что применение в качестве маркера в иммунохроматографических системах квантовых точек позволяет снизить предел обнаружения антибиотика хлорамфеникола в 24 раза по сравнению с тест-системами на основе коллоидного золота;

- разработаны иммунохроматографические тест-системы с флуоресцентными нанодисперсными маркерами - коллоидным золотом и квантовыми точками; определены и сопоставлены их аналитические параметры, установлено, что в условиях эксперимента квантовые точки детектируются в значительно (в 9 раз) меньшем количестве, чем частицы коллоидного золота;
- квантовые точки с разными флуоресцентными свойствами применены в качестве маркеров в мультиплексном иммунохроматографическом анализе; показана эффективность предложенного подхода для одновременного контроля содержания в объектах трех антибиотиков разных классов при минимальной пробоподготовке образца;
- предложен новый формат мультиплексного иммунохроматографического анализа, основанный на формировании упорядоченного двумерного массива зон связывания на мембране; этот подход апробирован для одновременного обнаружения и определения четырех психоактивных соединений с двумя пороговыми уровнями каждого из них.

Последние из перечисленных выше результатов представляют чрезвычайный интерес для решения важнейших задач биохимического анализа.

Описанию и обсуждению полученных результатов посвящена весьма объемная глава 3.

Все исследования проведены диссертантом впервые, полученные данные отличаются безусловной **научной новизной**.

Несомненную **практическую значимость** работы определяют:

- показанные автором преимущества флуоресцентного маркера, квантовых точек, по сравнению с колориметрическим маркером, коллоидным золотом, в обеспечении высокой чувствительности мембранного иммуноанализа;
- разработанные и апробированные иммунохроматографические тест-системы на основе квантовых точек для определения содержания антибиотика хлорамфеникола в молоке и иммуноглобулина Е в сыворотке крови человека при минимальной подготовке проб образцов.

Особый интерес представляют предложенные форматы мультиплексного иммунохроматографического анализа, основанные на использовании в качестве маркеров квантовых точек с разными спектрами эмиссии (и реализованная на основании этого тест-система для одновременного определения трех антибиотиков разных классов по исчезновению красной, желтой или зеленой аналитической линии), а также на формировании на мембране упорядоченного двумерного массива зон связывания с реагентами разной специфичности, что позволяет одновременно контролировать содержание психоактивных веществ разных классов.

Следует особо отметить системность и очень большой объем проведенного исследования, его четкую логику, структуру и обоснованность каждого этапа. Обращает на себя внимание тщательность и добросовестность диссертанта в проведении экспериментов: многократность повторения измерений, большие выборки изученных материалов и систем. Так, во многих случаях число параллельных измерений достигает 10; при выборе материала подложки изучены 9 видов нитроцеллюлозных мембран,

отличающихся по размеру пор и степени связывания белка; при разработке иммунохроматографической тест-системы в «сэндвич»-формате протестированы 16 сочетаний антител в составе определяемых комплексов; при апробировании предложенной автором иммунохроматографической тест-системы с использованием квантовых точек для определения уровня иммуноглобулина Е в сыворотке крови человека проанализированы 95 (!) клинических образцов.

Диссертационная работа изложена на 206 страницах машинописного текста, включает 79 рисунков и 25 таблиц. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов эксперимента и их обсуждения, заключения, перечня публикаций по теме диссертации, выводов и списка использованных библиографических источников, включающего 290 наименований современных отечественных и зарубежных работ.

В обзоре литературы (глава 1) рассмотрены, систематизированы и проанализированы известные на сегодняшний день иммунохимические тест-методы, основанные на различных принципах: агглютационного иммуноанализа; иммуноферментного анализа; поляризационного флуоресцентного иммуноанализа; иммуноанализа, основанного на резонансном переносе энергии; описаны иммунофльтрационные методы, иммуноафинные колонки, микрофлюидные и иммунохроматографические тест-системы. В отдельных разделах рассмотрены и обсуждены характеристики маркеров для иммунохимических тест-систем; описано применение иммунохимических тест-систем для мультиплексной детекции загрязнителей различных объектов; уделено внимание и вопросам кинетики иммунохимических взаимодействий в тест-системах и ее математического описания.

В главе 2 «Материалы и методы» приведены характеристики химических и иммунореагентов, описаны использованные в работе материалы и устройства, все методики синтеза, выделения, получения, изучения наночастиц, конъюгатов и др.; методики определения аналитических характеристик тест-систем, определения аналитов различными методами; методики изготовления иммунохроматографических тест-систем.

Работа написана очень четко, логично, грамотным языком, материал хорошо систематизирован и структурирован. Результаты исследований, проведенных диссертантом, доложены и обсуждены на 9 научных конференциях различного уровня – Всероссийских и международных. По материалам диссертации опубликовано большое количество статей – 5 в реферируемых международных и российских журналах и 9 тезисов докладов.

Автореферат полностью отражает основное содержание работы.

В целом диссертационная работа Н.А. Тарановой производит весьма благоприятное впечатление.

Тем не менее, по работе имеются некоторые вопросы и замечания.

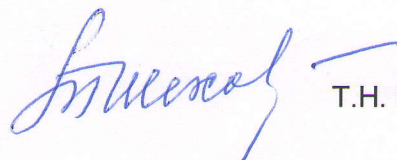
1. При оптимизации условий хранения тест-полосок для иммунохроматографического определения хлорамфеникола и IgE установлено, что наилучшая воспроизводимость

- результатов анализа достигается при хранении тест-полосок при комнатной температуре (с.124 и 143). Чем это можно объяснить?
2. Непонятно, как были получены характеристики (предел обнаружения и диапазон определяемых концентраций) иммунохроматографического определения хлорамфеникола, приведенные на стр. 126.
  3. Чем объясняется выбор соотношения КвТ 625: КвТ 585 : КвТ 525 равного 1:10:15 в смеси индивидуальных конъюгатов в детектирующем конъюгате антител с маркером (с.147)?
  4. В обзоре литературы логичнее было бы все английские надписи на рисунках заменить русскими, и в тексте экспериментальной части все аббревиатуры, в том числе EDC, CCMS, UCP, приводить на русском языке.
  5. При в основном грамотном оформлении диссертационной работы в ней имеются некоторые терминологические огрехи, например, «градуировочные» зависимости называются то правильно, то «калибровочными»; «интенсивность окрашивания» правильнее называть «интенсивностью поглощения».

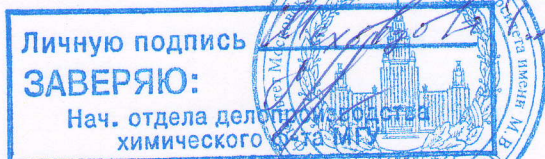
Указанные замечания не имеют принципиального значения и не снижают общую весьма положительную оценку работы.

**Диссертация Тарановой Надежды Алексеевны на тему «Комплексы антител с нанодисперсными носителями: синтез, свойства и применение в иммунохроматографии» по совокупности изложенных экспериментальных и теоретических данных, обладающих внутренним единством, актуальности, научной новизне, практической значимости, а также личному вкладу автора, соответствует п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.00.2013 г. № 842, и паспорту специальности 03.01.04 –Биохимия, а соискатель достоин присуждения ученой степени кандидата химических наук.**

Доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

  
Т.Н. Шеховцова

Рабочий адрес: 119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 3  
МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет  
Тел: 8 495 9393346; e-mail: [tnshekh@yandex.ru](mailto:tnshekh@yandex.ru)



**Ларионова И.С.**