

УТВЕРЖДАЮ



Проректор по науке Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

д. х. н., доцент А.А. Щербина

18 » сентября 2020 г.

ОТЗЫВ

Ведущей организации - Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» на диссертацию Капустина Дмитрия Валерьевича «Фторполимер- и полианилинсодержащие композиты как эффективный инструмент молекулярной биотехнологии», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 02.00.06 - высокомолекулярные соединения.

Результатом прогресса современной бионанотехнологии стало создание целого ряда высокоэффективных методов молекулярной диагностики, в которых в качестве матриц, а также компонентов реакций молекулярного узнавания используются биополимеры, такие как нуклеиновые кислоты и белки. Одним из незаменимых методов диагностики стал ПЦР-анализ, возможности которого сложно переоценить. Тем не менее, выбор оптимального способа подготовки биоматериала к ПЦР-исследованию нередко осложняется присутствием в пробе мощных ингибиторов полимеразы, например, гема в образцах крови, хлорофиллов в образцах растительной ткани, гуминовых веществ в образцах почв. До последнего времени не был разработан универсальный метод пробоподготовки с использованием подходящего синтетического сорбента, позволяющий эффективно выделять чистые препараты нуклеиновых кислот различных классов организмов из биологических образцов.

Известные способы выделения биополимеров из биологических образцов, основанные на адсорбции молекул нуклеиновых кислот на поверхности твердых сорбентов, как правило, многостадийны и трудоемки, что приводит к снижению выхода выделяемого биополимера. Эти способы, в соответствие с терминологией, предложенной диссертантом, основаны на использовании т. н. эффекта «позитивной селекции» в отношении нуклеиновых кислот, когда молекулы выделяемой нуклеиновой кислоты удерживаются сорбентом на первой стадии выделения, после чего необходимо проводить отмывку полученного комплекса «сорбент-нуклеиновая кислота» от примесей, а затем элюировать очищенную нуклеиновую кислоту с поверхности или из объема пор сорбента. На каждом этапе выделения некоторая часть выделяемого компонента биологической смеси теряется, в результате чего не всегда удается достичь требуемого выхода нуклеиновой кислоты.

Диссертант пришел к справедливому заключению о том, что необходима новая методология получения сорбционных материалов и способов их применения, позволяющая реализовать одностадийную схему выделения нуклеиновой кислоты из образца в условиях, когда выделяемый биополимер после нанесения биологической пробы на сорбент не удерживается, а выходит в

исключенном объеме, в то время как прочие компоненты пробы удерживаются сорбентом. Этот эффект назван автором диссертации «негативной селекцией».

Предложенный диссертантом подход к выделению биополимеров из биологических проб, несомненно, отличается новизной. Диссертационная работа Д.В. Капустина является междисциплинарным исследованием, в рамках которого разработаны концепции получения и применения полимерсодержащих композитов, демонстрирующих эффект «негативной селекции» в отношении нуклеиновых кислот и одновременно демонстрирующих эффект «позитивной селекции» в отношении белков. В ходе исследований диссертантом разработаны и масштабированы несколько технологических схем прямого синтеза наноструктурированных полимерсодержащих сорбентов, в результате чего удалось совместить синтез макромолекул и получение наноструктурированного продукта с использованием различных твердых носителей, таких как объемно-пористые кремнеземы, синтетические мембраны, стеклянные мультикапилляры, кремниевые пластины и др.

В качестве основного объекта исследования диссертант объединил весьма различные по химической структуре полимеры, такие как фторсодержащие полимеры, полиарамиды и полианилины. Д.В. Капустиным убедительно продемонстрировано, что материалы, поверхностно модифицированными нанослоями указанных полимеров, не удерживают двунитевую ДНК, слабо удерживают молекулы РНК и обратимо удерживают белковые молекулы. Обнаруженный эффект позволил автору впервые реализовать способы одностадийного выделения нуклеиновых кислот из биологических проб сложного состава.

Разработанные диссертантом технологические подходы к иммобилизации нанотолщинных полимерных покрытий на пористых и непористых носителях различной природы формально подразделены на две группы. Полимерсодержащие композиты, относящиеся к первой группе, получены в результате полимеризации в присутствии неактивированных носителей. К этой группе, например, отнесен способ получения ПАНИ-содержащих сорбентов в результате химического осаждения полимерного нанопокртия, а также отнесены способы, предусматривающие нанесение олигомерного или полимерного прекурсора на поверхность носителя методом «кастинга» с последующим химическим отверждением получаемого покрытия.

Ко второй группе отнесены способы синтеза сорбентов, основанные на локализации процесса полимеризации на поверхности твердого носителя, предварительно активированного тем или иным способом. Так, «матричную» полимеризацию анилина проводили в присутствии иммобилизованных на поверхности носителя полисульфокислот, являющихся источниками катионов водорода. На поверхности кремнеземных частиц, поверхность которых была предварительно активирована озоном за счет присутствия в кремнеземе металлсодержащих примесей, получали нанопокртия в результате полимеризации фтормономеров, анилина и др. мономеров, полимеризующихся по различным механизмам. Таким образом, диссертантом был разработан способ получения гетерофазного инициатора полимеризации, когда твердофазный инициатор одновременно являлся носителем при синтезе композита.

Еще один вариант «матричной полимеризации» анилина на поверхности носителей, предварительно гидрофобизованных фторсодержащими полимерами, позволил диссертанту существенно увеличить выход полимера, связанного с поверхностью носителя, что положительно сказалось на повышении технологичности процесса синтеза сорбента.

Диссертантом комплексно исследованы физико-химические свойства полученных композитов и их сорбционные свойства в отношении нуклеиновых кислот и белков, разработаны оригинальные конструкции биосепарирующих элементов, в состав которых входят разработанные сорбенты, а также протоколы пробоподготовки для выделения биополимеров из биологических источников различной природы с помощью разработанных биосепарирующих элементов.

Диссертация Д.В. Капустина построена по традиционной схеме, включает введение, пять глав, выводы, библиографический список (439 наименований), изложена на 382 страницах, содержит 36 таблиц и 127 рисунков.

В первой главе (Обзор литературы) обсуждаются известные методы выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов и физико-химические процессы, положенные в основу этих методов. Затем обсуждаются свойства различных твердых носителей, применяемых при получении композиционных сорбентов (таких как, например, объемно-пористые кремнеземы, синтетические мембраны, стеклянные мультикапилляры). Далее в главе рассматриваются различные методы синтеза композиционных сорбентов, предназначенных для разделения компонентов биологических смесей.

Нельзя не отметить, что представленный в диссертационной работе обзор литературы в значительной степени отражает хронологию развития подходов к синтезу сорбентов, что, несомненно, облегчило диссертанту задачу обоснования выбора носителей и полимерных модификаторов, использованных в исследовании.

Во второй главе кроме объектов исследования (в частности, носителей, полимерных модификаторов, исходных соединений, биологических образцов), представлено детальное описание методов синтеза разработанных композитов, а также методов исследования физико-химических и сорбционных свойств полученных материалов.

В третьей главе диссертации Д.В. Капустин экспериментально подтверждает свое предположение о том, что эффект «негативной селекции» в отношении нуклеиновых кислот могут демонстрировать различные по химическому составу и структуре полимеры. Это подтверждение сделано диссертантом на основании результатов комплексного исследования сорбционных свойств исследованных им полимерных нанопокровов в отношении биополимеров с применением современных инструментальных методов анализа, таких как рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия, сканирующая зондовая микроскопия, спектрально-корреляционная интерферометрия и др. В результате сравнительного анализа данных, полученных при исследовании стационарной и динамической сорбции биополимеров на разработанных полимерных покрытиях, диссертант убедительно продемонстрировал, что результат сорбции нуклеиновых кислот и белков на поверхности исследованных полимеров определяется суммарным вкладом различных механизмов

сорбции, происходящей как в результате диполь-дипольных и гидрофобных взаимодействий, так и в результате образования водородных связей.

Четвертая глава диссертации посвящена обсуждению разработанных в ходе исследования способов синтеза полимерсодержащих композитов и результатов комплексной характеристики физико-химических свойств полученных полимерных покрытий.

Таким образом, существенная часть диссертации Д.В. Капустина посвящена разработке методологии получения композиционных полимерсодержащих материалов, в частности посредством прямого синтеза, т. е. относится к области химии и физикохимии высокомолекулярных соединений.

Примерно такой же объем диссертации отведен пятой главе, в которой раскрыта методология разработки различных биосепарирующих элементов, в состав которых включены полученные композиты, определены принципы и области их наиболее эффективного практического применения. Д.В. Капустиным разработана линейка биосепарирующих элементов различной конструкции, содержащих полученные сорбенты на основе объемно-пористых кремнеземов, синтетических мембран, стеклянных мультикапилляров, кремниевых чипов и др.

Д.В. Капустин с успехом использовал разработанные им материалы для решения разнообразных биотехнологических задач. Так, в пятой главе обсуждаются результаты пробоподготовки, предшествующей проведению ПЦР-диагностики, полученные при одностадийном выделении нуклеиновых кислот из бактерий, вирусов, одноклеточных и многоклеточных грибов, тканей растений, животных и человека. Эффективность применения разработанных диссертантом материалов подтверждена как при использовании модельных, так и клинических образцов, таких как уrogenитальные мазки, лизаты крови и плазмы, лизаты образцов пищевых и косметических продуктов, экстрактов почвы. Универсальность и высокая эффективность применения биосепарирующих элементов, содержащих разработанные сорбенты, продемонстрирована диссертантом на примерах выделения нуклеиновых кислот из проб, различающихся как по происхождению нуклеиновых кислот (вирусы, прокариоты, эукариоты), их источнику (бактериальные культуры, биологические жидкости, ткани грибов, растений и животных, почвенные экстракты, пищевые продукты и др.), так и по способу подготовки пробы (лизаты, экстракты, фильтраты, смывы и пр.). В частности, приведены экспериментальные доказательства практической ценности разработанной диссертантом схемы одностадийного выделения нуклеиновых кислот для ПЦР-диагностики бактериальных и дрожжевых уrogenитальных инфекций, социально-опасных бактериальных и вирусных инфекций, таких как туберкулез, гепатит В, гепатит ТTV, а также фитопатогенных грибов, вызывающих фузариоз.

Наряду с примерами эффективного применения разработанных сорбентов в пробоподготовке для молекулярной диагностики в пятой главе обсуждаются результаты применения полученных композитов для количественной очистки ПЦР-фрагментов от компонентов ПЦР-смеси, в качестве носителей для твердофазного синтеза олигонуклеотидов, а также в качестве сорбентов, применяемых для одновременного определения содержания производных жирно- и водорастворимых витаминов в крови человека. Отдельного внимания заслуживают результаты использования кремниевых чипов,

поверхностно модифицированных сополимерами анилина с 3-аминобензойной кислотой в качестве рабочих тел в масс-спектрометрии пептидов. Диссертантом убедительно продемонстрировано, что подобным композитам не только присуща хроматографическая активность, что обеспечивает возможность обогащения аналитом исследуемой масс-спектрометрическим методом пробы, но одновременно такие материалы проявляют «матричную» активность, т. е. способны аккумулировать энергию лазерного излучения, в результате чего отпадает необходимость в добавлении «вещества-матрицы» к пробе. В результате регистрируемые масс-спектры не содержат многочисленных сигналов «вещества-матрицы» в низкомолекулярной области спектра, что значительно упрощает анализ. В заключении главы приведена наглядная таблица, демонстрирующая широту областей применения разработанных диссертантом полимерсодержащих композитов.

Подводя итог, можно утверждать, что диссертационная работа Капустина Дмитрия Валерьевича является серьезным, законченным и практически полезным научным трудом, выполненном на высочайшем экспериментальном и теоретическом уровнях. Весьма значительный по объему проведенных исследований экспериментальный материал, представленный в диссертации, получен автором в сотрудничестве как с его коллегами из ИБХ РАН, так и с другими многочисленными российскими и зарубежными научными учреждениями. Диссертант продемонстрировал свое умение организовывать междисциплинарные и разноплановые исследования с участием физически удаленных друг от друга научных коллективов. Благодаря этому впервые были успешно решены фундаментальные химические и материаловедческие задачи, связанные с синтезом полимерсодержащих композитов, демонстрирующих эффект «негативной селекции» в отношении нуклеиновых кислот, а также проблемы, связанные с разработкой технологий получения таких материалов. Параллельно были установлены оптимальные условия использования разработанных композитов с учетом разнообразных аспектов их биотехнологического применения.

Графический и табличный материал диссертации в полной мере иллюстрирует теоретические и методические положения диссертации и полученные экспериментальные результаты, достоверность которых не вызывает сомнений и подтверждается использованием современного оборудования и комплекса различных синтетических, физико-химических, аналитических и молекулярно-диагностических методов исследования. Представленные в диссертации выводы обоснованы. Автореферат в точности отражает содержание диссертации, которое в полной мере отражено в научных работах автора, опубликованных в ведущих зарубежных и отечественных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для опубликования основных результатов диссертации.

Разработанные в докторской диссертации Д.В. Капустина стратегии синтеза и применения полимер-модифицированных композитов представляются весьма перспективными для практического использования, в особенности, учитывая современную ситуацию распространения нового коронавируса. Предлагаемые диссертантом методы, подходы и практические результаты следует рекомендовать в качестве полезного материала при чтении лекций и проведении студенческих практикумов на профильных кафедрах ВУЗов, а полученные в результате исследования материалы

вполне пригодны в качестве компонентов диагностических наборов для использования в лабораториях клинико-диагностического профиля.

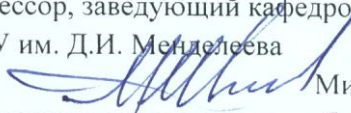
Принципиальных замечаний по содержанию представленной диссертации нет, тем не менее, есть вопросы, которые следует пояснить:

1. Представляется уместным привести сравнительную оценку себестоимости мини-колонки с разработанными диссертантом сорбентами с представленными на рынке диагностическими наборами.
2. В тексте диссертации встречаются опечатки.
3. Некоторые ссылки на URL-адреса в списке литературы не являются активными.

Указанные замечания вовсе не снижают положительного впечатления от диссертации Д.В. Капустина, не умаляют ее научной ценности и носят рекомендательный характер.

Таким образом, докторская диссертация Д.В. Капустина является научно-квалификационной работой, в которой решена научная проблема, имеющая важное хозяйственное значение для развития бионанотехнологий, основанных на применении полимерсодержащих композиционных материалов, а также изложены новые научно обоснованные технологические решения по созданию таких композитов и по методологии их использования. По своей актуальности, новизне, уровню изложения, теоретическому и практическому значению диссертация Д.В. Капустина полностью соответствуют всем требованиям (в том числе п. 9) «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Капустин Дмитрий Валерьевич заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора химических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 02.00.06 - высокомолекулярные соединения.

Отзыв на диссертационную работу обсужден на заседании Кафедры биоматериалов ФГБУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» (Протокол № 1 от «31» августа 2020 г.).

Отзыв подготовил доктор химических наук,
профессор, заведующий кафедрой биоматериалов
РХТУ им. Д.И. Менделеева
 Михаил Исаакович Шильман
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Российский химико-
технологический университет имени Д.И. Менделеева».
Адрес: 125047, г. Москва, Миусская пл., д. 9.
Тел.: +7(495)978-86-60; e-mail: shtilmanm@yandex.ru

Подпись профессора М.И. Шильмана удостоверяю
Ученый секретарь РХТУ им. Д.И. Менделеева
к.х.н., доцент

«08» сентября 2020 г.



Н/К.Калинина