

## ОТЗЫВ

официального оппонента 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.

Одно из актуальных направлений современной бионанотехнологии посвящено разработке эффективных способов пробоподготовки для повышения чувствительности методов молекулярной диагностики, в частности, за счет повышения выхода высокоочищенных препаратов биополимеров (прежде всего, нуклеиновых кислот) в результате их выделения из биологических образцов сложного состава. Выделенные препараты нуклеиновых кислот используют в качестве матриц в молекулярной диагностике, в частности, в ПЦР-анализе. До сих пор серьезной проблемой в ПЦР-диагностике оставался выбор конкретного способа подготовки материала к исследованию, поскольку не были известны методы, позволяющие одинаково эффективно выделять удовлетворительно очищенные нуклеиновые кислоты разных классов организмов из различных биологических проб. Как правило, к протоколам пробоподготовки образцов предъявлялись требования к количественному выходу и к степени очистки выделяемого биополимера, однако сегодня необходимо также учитывать экономию времени за счет сокращения числа этапов выделения, обеспечивать максимальное упрощение аппаратного оформления самой процедуры, ее миниатюризацию и возможность автоматизации.

Методы выделения биополимеров из биологических смесей включают жидкостную экстракцию, осаждение и адсорбцию с использованием различных сорбентов. Эти методы многостадийны, трудоемки и часто сопровождаются потерями выделяемого компонента. При использовании сорбентов происходит «улавливание» целевого биополимера сорбентом на первом этапе разделения (т. е. «позитивная селекция»), вслед за чем необходимо смыть ненужные компоненты смеси и элюировать целевой компонент с сорбента. В результате каждый этап выделения сопровождается потерями выделяемого компонента и не всегда достигается количественное воспроизведение результата выделения.

Диссертантом сделано справедливое утверждение о необходимости в разработке новых материалов и соответствующей методологии, позволяющих реализовать одностадийную схему выделения целевого компонента смеси, в результате чего выделяемый (и очищаемый) биополимер после нанесения биологической смеси на сорбент, не удерживаясь, выходит в исключенном объеме (в результате т.н. «негативной селекции»), в то время как прочие компоненты удерживаются сорбентом. Следует отметить, что термины «позитивная селекция» и «негативная селекция» в данном контексте впервые введены именно в работе Д.В. Капустина.

Разработанный диссертантом подход является новым и отчасти неожиданным. В целом, диссертационная работа Д.В. Капустина является междисциплинарным исследованием и посвящена разработке основных концепций получения и применения полимерсодержащих композитов, демонстрирующих эффект «негативной селекции» в отношении НК для решения биотехнологических и биоаналитических задач.

Для решения поставленной задачи автору было необходимо разработать соответствующие технологии, в том числе прямой синтез наноструктурированных композитов, исследовать физико-

химические и сорбционные свойства получаемых материалов в отношении нуклеиновых кислот и белков, а также разработать оптимальные конструкции биосепарирующих элементов - как альтернативу хроматографическим колонкам. Не менее актуальной проблемой явилась отработка оптимальных протоколов пробоподготовки для выделения биополимеров из различных источников с помощью разрабатываемых элементов с целью достижения заданных параметров выделения, таких как выход, степень очистки, число манипуляций, затрачиваемое время.

Однако не только этим определяется актуальность и новизна работы Д.В. Капустина. Диссертанту удалось объединить в качестве объекта исследования такие различные по химической природе вещества, как фторсодержащие полимеры, полиарамиды и полианилины. Д.В. Капустин убедительно продемонстрировано, что материалы, поверхностно модифицированными нанослоями указанных полимеров, не удерживают двуниевую ДНК, обратимо удерживают РНК и белки в зависимости от значений изоэлектрических точек последних. Это позволило автору впервые реализовать способы одностадийного выделения нуклеиновых кислот из биологических смесей сложного состава. С целью разработки полимерсодержащих материалов, сорбционные свойства которых принципиально отличны от сорбционных свойств традиционных сорбентов, используемых при выделении биополимеров, автором разработан целый ряд технологических приемов, позволяющих иммобилизовать нанотолщинные полимерные покрытия на твердых объемно-пористых и непористых носителях различной природы, например, на поверхности кремнеземов, синтетических мембран, мультикапиллярных стеклянных систем, кремниевых пластин и др.

Эти приемы формально подразделены диссертантом на две основные группы. К первой группе относятся способы, в которых композит с полимерным нанопокрытием получали в результате полимеризации мономера в присутствии неактивированного носителя. Сюда следует отнести способы получения полианилинсодержащих композитов путем химического осаждения полимерного нанопокрытия. К этой группе также следует отнести способы, в которых слой готового прекурсора (т. е. олигомера или полимера) предварительно наносили на поверхность носителя методом «кастинга», а затем иммобилизовали на поверхности носителя за счет химического отверждения, в том числе, в результате полимераналогичных превращений. В качестве примера следует привести способ получения полифторбутадиенсодержащего сорбента методом кастинга с последующим фторированием парами дифторида ксенона.

Вторая группа разработанных диссертантом методов включает способы синтеза композитов, основанные на локализации процесса полимеризации на активированной поверхности носителя, т. е. когда полимеризация инициируется определенными функциональными группами на поверхности носителя и протекает на его поверхности. С целью локализации процесса полимеризации анилина на поверхности носителя диссертантом разработан ряд способов, основанных на предварительной иммобилизации на поверхности носителя полимерных нанослоев, содержащих функциональные группы – источники протонов – при проведении «матричной» полимеризации анилина в присутствии иммобилизованных полисульфокислот. Для локализации полимеризации мономеров, полимеризующихся по различным механизмам, таких как фтормономеры, анилин и др., диссертантом

разработан способ активации кремнеземной матрицы озоном, позволивший получить гетерофазный инициатор полимеризации, поверхность которого одновременно служит подложкой при синтезе сорбента. Другие разработанные диссертантом варианты синтеза композитов основаны на полимеризации анилина в присутствии матриц, поверхность которых предварительно обработана гидрофобными фторсодержащими полимерами. Соответствующие технологические схемы получения композитов основаны на понимании и умелом использовании диссертантом особенностей полимеризации анилина.

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

Отдельного внимания заслуживает первая глава диссертации – обзор литературы, содержащий несколько подразделов. В начале обзора рассмотрены основные методы, применяемые в практике клинических и исследовательских лабораторий для выделения нуклеиновых кислот и физико-химические процессы, лежащие в основе таких методов. В следующих подразделах рассмотрены различные типы носителей. Такие носители, как кремнеземы и синтетические мембраны, - широко применяются при получении композиционных сорбентов, в отличие от стеклянных мультикапилляров, которые, тем не менее, представляются перспективными в этом качестве. Отдельно рассмотрены основные физические и химические методы синтеза композиционных сорбентов, применяемых при разделении компонентов биологических смесей, в частности, смесей, содержащих биополимеры. В целом, в Главе 1 отражена хронология развития методов синтеза таких материалов, что, не в последнюю очередь, помогло диссертанту правильно обосновать выбор использованных им полимерных модификаторов и носителей.

Практическая часть рассматриваемой диссертации включает 4 главы. Во второй главе рассмотрены объекты исследования, т.е. носители, полимерные модификаторы и исходные соединения, необходимые для их получения, а также разработанные диссертантом методы синтеза композиционных полимерсодержащих материалов и использованные в работе методы исследования их физико-химических и сорбционных свойств.

Третья глава диссертации посвящена исследованию сорбционных свойств фторполимер-, полиарамид- и полианилинсодержащих покрытий. Диссертантом проведено комплексное исследование с использованием инновационных методов, в частности, спектрально-корреляционной интерферометрии, что позволило сопоставить данные, полученные в режимах статической и динамической сорбции биополимеров на поверхности разработанных им полимерных покрытий, и сделать выводы о сложном характере механизмов сорбции нуклеиновых кислот и белков на поверхности исследованных полимеров, что подтвердило исходное предположение о том, что эффект «негативной селекции» могут проявлять различные по химическому составу и структуре полимеры.

В четвертой главе диссертантом подробно рассмотрены разработанные им технологические способы синтеза полимерсодержащих композитов для выделения биополимеров и проведена комплексная характеристика полученных полимерных покрытий.

Наконец, пятая глава посвящена применению разработанных композитов в составе различных биосепарирующих элементов, отличающихся конструкцией в зависимости от их назначения. Эта глава включает шесть подразделов, в первом из которых описаны результаты применения в пробоподготовке для проведения ПЦР-анализа при одностадийном выделении ДНК и/или РНК бактерий, одноклеточных и многоклеточных грибов, вирусов, растений, животных, человека из модельных и клинических образцов, в частности, из мазков, из лизатов крови и плазмы, пищевых и косметических продуктов, из экстрактов почвы и др. В последующих подразделах обсуждаются результаты использования разработанных материалов для очистки синтетических олигонуклеотидов и ПЦР-фрагментов, в качестве носителей для твердофазного синтеза олигонуклеотидов, для определения содержания витаминов в крови человека и в качестве рабочих тел в масс-спектрометрии пептидов. В заключении главы дано сравнительное обсуждение областей применения разработанных фторполимер- и полианилинсодержащих композитов.

Таким образом, диссертантом обнаружен и исследован эффект низкой сорбционной активности ряда полимеров, таких как фторполимеры, полианилины и полиарамиды, по отношению к нуклеиновым кислотам – т.е. эффект «негативной селекции», при одновременной высокой сорбционной активности тех же полимеров по отношению к белковым компонентам биологических смесей, т.е. эффект, названный диссертантом «позитивной селекцией». На основании результатов исследования обнаруженного эффекта были впервые разработаны оригинальные одностадийные схемы выделения из различных источников препаратов нуклеиновых кислот, непосредственно пригодных для ПЦР-анализа, а также белков и др. биологически-активных соединений для иных биомедицинских исследований.

Диссертант исследовал механизм селективной сорбции ДНК, РНК и белков на поверхности разработанных полимерных покрытий в статических и динамических условиях, в результате чего было показано, что количественные параметры сорбции зависят как от химической структуры полимерного слоя в составе сорбента, так и от природы молекул сорбата, и в значительно меньшей степени – от морфологии поверхности сорбента.

Диссертантом разработаны технологичные масштабируемые методы получения твердых композиционных сорбентов, представляющих собой как пористые, так и непористые носители, модифицированные функциональными нанотолщинными слоями полимеров, демонстрирующих эффект «негативной селекции» в отношении молекул нуклеиновых кислот. С помощью разработанных методов получена серия композиционных сорбентов, отличающихся как химическим строением полимерных модификаторов, так и природой носителя; разработана линейка биосепарирующих элементов различной конструкции, содержащих полученные сорбенты.

На множестве примеров продемонстрирована высокая эффективность и универсальность применения биосепарирующих элементов, содержащих разработанные сорбенты, с целью одностадийного выделения нуклеиновых кислот из биологических проб, различающихся по происхождению (вирусы, прокариоты, эукариоты), источнику (бактериальные культуры, биологические жидкости, ткани грибов, растений и животных, почвенные экстракты, пищевые продукты и др.) и способу подготовки (лизаты, экстракты, фильтраты, смывы и пр.). Экспериментально доказана

практическая ценность разработанных способов пробоподготовки с использованием полученных сорбентов для ПЦР-диагностики бактериальных и дрожжевых урогентиальных инфекций, социально-опасных бактериальных и вирусных инфекций (таких как туберкулез человека, гепатит В, гепатит ТТV), а также фитопатогенных грибов, вызывающих фузариоз.

Наконец, показана высокая эффективность разработанных полимерсодержащих композитов в качестве носителей для твердофазного синтеза олигонуклеотидов и сорбентов для одновременного выделения жиро- и водорастворимых витаминов из крови человека, а также в качестве «рабочих тел» для масс-спектрометрии.

Резюмируя, можно утверждать, что диссертационная работа Капустина Дмитрия Валерьевича, безусловно, является серьезным завершенным научным трудом, выполненном на высочайшем экспериментальном и теоретическом уровне. Представленная работа описывает громадный экспериментальный материал, полученный автором в содружестве с его коллегами из ИБХ РАН и других российских и зарубежных научных институтов. Нельзя не отметить умение диссертанта организовать сложные и разноплановые исследования с участием целого ряда удаленных друг от друга научных коллективов, благодаря чему автору удалось провести комплексное исследование как фундаментальных материаловедческих, так и прикладных биотехнологических аспектов разрабатываемых материалов.

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 полностью отражает содержание диссертации, которое полностью отражено в многочисленных научных публикациях автора, в ведущих зарубежных и отечественных рецензируемых журналах, рекомендованных для опубликования основных результатов диссертации.

Разработанные в докторской диссертации стратегии создания и применения полимермодифицированных композитов имеют хорошие перспективы для практического использования, особенно принимая во внимания современную ситуацию, возникшую в связи с повсеместным распространением нового опасного вируса. Предложенные в диссертации методы, подходы и полученные результаты могут быть использованы при чтении лекций и при проведении студенческих практикумов на профильных кафедрах российских университетов и институтов.

Принципиальных замечаний по представленной работе нет. Однако есть несколько вопросов, которые требуют пояснения:

1. Возможно, было бы целесообразным изменить порядок изложения материала и в первую очередь представить разработанные методы синтеза композитов, а затем главу, посвященную исследованию сорбционных свойств полученных материалов.

2. В подразделе, относящемся к выделению ДНК из образцов почв, не приведено сравнение с существующими методиками по выделению нуклеиновых кислот из почв по эффективности выделения (выход нуклеиновой кислоты, затрачиваемое время, чистота).

3. В заключении диссертации было бы уместным привести хотя бы предварительную оценку экономического эффекта от возможного внедрения разработанных композитов (в частности, сравнить себестоимость производства наборов, включающих разработанные мини-колонки, с существующими на рынке диагностическими наборами).

Указанные замечания несколько не умаляют научной ценности работы Д.В. Капустина, носят рекомендательный характер и никак не портят общего впечатления.

Таким образом, диссертация Капустина Д.В. является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена научная проблема, имеющая важное хозяйственное значение для развития бионанотехнологий, в которых применяются полимерсодержащие сорбционные материалы, а также изложены новые научно обоснованные технологические решения по созданию таких материалов и по методологии их использования. По своей актуальности, новизне, уровню изложения, теоретическому и практическому значению диссертация Капустина Д.В. полностью соответствует 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.

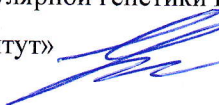
Официальный оппонент, директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Институт молекулярной генетики Национального  
исследовательского центра «Курчатовский институт»  
чл.-корр. РАН, д.х.н, проф.



Костров Сергей Викторович

Подпись д.х.н. Кострова С.В. удостоверяю.

Заместитель директора Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Институт молекулярной генетики Национального  
исследовательского центра «Курчатовский институт»



Филиппов Максим Владимирович

123182, г. Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2.  
Телефон: +7(499)196-00-00 E-mail: [kostrov@img.ras.ru](mailto:kostrov@img.ras.ru)

