

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.

Высокая эффективность современных методов молекулярной диагностики в распознавании патологий и генетически обусловленных заболеваний в значительной мере определяется открытием процесса искусственного многократного копирования ДНК - полимеразной цепной реакции. ПЦР-анализ - высокочувствительный и селективный метод, однако до сих пор серьезной проблемой при проведении ПЦР-анализа оставался выбор способа подготовки материала к исследованию, поскольку до последнего времени не был известен материал, позволяющий одинаково эффективно выделять удовлетворительно очищенные нуклеиновые кислоты разных классов организмов из различных биологических проб. Сказанное справедливо и в отношении выделения белков, поскольку присутствие примесей в выделенном биополимере оказывает существенное влияние на эффективность его дальнейшего применения в биоинженерии, медицинской диагностике или в качестве компонента лекарственных средств.

Применяемые в настоящее время методы выделения биополимеров из биологических проб (в частности, методы, основанные на обратимой адсорбции с использованием твердых сорбентов) – как правило, трудоемки и не обеспечивают максимально возможный выход очищенного биополимера, поскольку на первой стадии выделения выделяемый биополимер удерживается поверхностью сорбента (диссертант называет эту стадию термином «позитивная селекция»). На последующих стадиях выделения полученный комплекс биополимер/сорбент отмывают от загрязняющих примесей, а затем смывают целевой компонент биологической смеси водой или подходящим солевым буферным раствором. Многостадийность процедуры приводит к потерям выделяемого компонента на каждом этапе выделения, что мешает достижению количественного воспроизведения результата выделения.

Диссертант справедливо утверждает о необходимости в разработке новых материалов, а также о методологии их получения и применения, которые позволят реализовать одностадийную схему выделения целевого компонента биологической смеси. В результате применения таких материалов выделяемый и одновременно очищаемый биополимер после нанесения биологической смеси на сорбент, не удерживаясь, выделяется в составе исключенного объема, в то время как прочие компоненты удерживаются сорбентом. Механизм, положенный в основу предлагаемой одностадийной схемы выделения нуклеиновых кислот, обозначен диссертантом термином «негативная селекция».

В рамках диссертационной работы Д.В. Капустина впервые разработана концепция получения и применения полимерсодержащих композитов, демонстрирующих эффект

«негативной селекции» в отношении нуклеиновых кислот и одновременно эффект «позитивной селекции» в отношении белков для решения ряда биотехнологических и биоаналитических задач. Не вызывает сомнений, что разработанный диссертантом подход к получению сорбционных материалов, предназначенных для выделения биополимеров для молекулярной диагностики, актуален и отличается новизной.

Одна из основных задач, решенных диссертантом, состояла в разработке методологии получения сорбционных материалов, обеспечивающих одностадийную процедуру выделения целевого биополимера из биологических образцов. Диссертант разработал ряд оригинальных технологий для получения полимерсодержащих композитов, демонстрирующих эффект «негативной селекции» в отношении нуклеиновых кислот. В основном, эти технологии основаны на проведении прямого синтеза наноструктурированных композитов, в процессе которого одновременно происходит синтез макромолекул и получение наноструктурированного композиционного сорбента. Разработанные диссертантом способы получения нанотолщинных полимерных покрытий фторполимеров и полианилинов на твердых пористых и непористых носителях различной природы следует отнести, по крайней мере, к двум группам. К первой группе относятся способы получения композиционных сорбентов в присутствии неактивированного носителя. Вторая группа методов основана на проведении полимеризации в присутствии активированной тем или иным способом поверхности носителя.

В диссертации представлены результаты исследования физико-химических и сорбционных свойств полученных материалов, приведено описание оптимальных конструкций биосепарирующих элементов, в составе которых используются разработанные композиты. Объектами исследования Д.В. Капустина оказались весьма различные по химической структуре полимеры, в частности, фторсодержащие полимеры, полиарамиды и полианилины. Диссертант убедительно продемонстрировал, что, несмотря на различия в химической структуре выбранных полимерных модификаторов, композиты, поверхность которых покрыта нанослоями указанных полимеров, проявляют общее свойство. Они не удерживают двунитевую ДНК, слабо удерживают РНК и обратимо удерживают молекулы белков. Обнаруженное диссертантом свойство позволило ему впервые разработать ряд эффективных протоколов одностадийного выделения нуклеиновых кислот из разнообразных биологических смесей, что явилось решением второй основной задачи исследования.

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

Литературный обзор (Глава 1) посвящен методам выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов, а также физико-химическим процессам, положенным в основу этих методов. Обсуждаются твердые носители, используемые при получении композиционных сорбентов (в частности, кремнеземы, синтетические мембраны, стеклянные мультикапилляры). Подробно рассмотрены физические и химические методы синтеза

композиционных сорбентов, применяемых при разделении компонентов биологических смесей. Представленный обзор научной литературы отражает хронологию развития методов синтеза сорбентов и способов их применения, что, несомненно, поспособствовало правильному обоснованию выбора объектов проведенного диссертантом исследования.

Практическая часть диссертации изложена в последующих четырех главах. Во второй главе приведены характеристики объектов исследования, в частности, носителей, полимерных модификаторов и соответствующих исходных реагентов, а также использованных биологических образцов. Дано подробное описание разработанных диссертантом методов синтеза композиционных полимерсодержащих сорбентов, а также методов исследования физико-химических и сорбционных свойств полученных композитов.

В третьей главе диссертации Д.В. Капустина обсуждаются результаты комплексного исследования сорбционных свойств фторполимер-, полиарамид- и полианилинсодержащих покрытий с применением рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии, сканирующей зондовой микроскопии, спектрально-корреляционной интерферометрии и др. методов. Полученные результаты подтвердили предположение диссертанта о том, что эффект «негативной селекции» в отношении нуклеиновых кислот могут демонстрировать различные по химическому составу и структуре полимеры. Диссертант сопоставил данные, полученные им при исследовании сорбции биополимеров на поверхности разработанных полимерных покрытий в стационарном и динамическом режимах. В результате было показано, что на исследованных полимерных поверхностях молекулы биополимеров избирательно удерживаются благодаря вкладу различных механизмов сорбции, происходящей в результате образования водородных связей, а также гидрофобных и диполь-дипольных взаимодействий.

Особенности разработанных диссертантом оригинальных и технологичных способов синтеза полимерсодержащих композиционных сорбентов рассмотрены в четвертой главе диссертации. Здесь же обсуждаются физико-химические свойства полученных полимерных покрытий.

Хотелось бы отметить, что если в первых главах диссертант представил результаты разработки технологичных способов получения полимерсодержащих сорбентов с использованием различных физико-химических и синтетических методов, то пятая глава, не уступающая по объему предшествующим главам в их совокупности, непосредственно посвящена биотехнологическому применению разработанных материалов в составе различных биосепарирующих элементов. В начале этой главы приведены результаты одностадийного выделения нуклеиновых кислот из разнообразных биологических образцов. Следует обратить внимание на весьма широкий спектр биологических объектов, использованных диссертантом. В исследовании использованы образцы, содержащие вирусные частицы, бактерии, одноклеточные и многоклеточные грибы, клетки растений, животных и человека. Выделение нуклеиновых кислот осуществляли как из модельных, так и из реальных образцов, таких как уrogenитальные мазки, образцы мокроты, лизаты крови и плазмы, из

экстрактов пищевых и косметических продуктов, образцов почвы и пр. Диссертант продемонстрировал высокую эффективность применения разработанных им материалов в пробоподготовке при проведении молекулярной диагностики возбудителей опасных заболеваний, таких как, например, туберкулез, гепатит В и ряда др. Несмотря на разнообразие использованных в исследовании образцов, в качестве сорбентов, как правило, использованы материалы, в состав которых были включены всего два полимерных модификатора: полианилин и фторопласт, либо их сочетание. В этом, в частности, проявляется универсальность разработанных диссертантом композитов.

В пятой главе диссертации также обсуждаются результаты применения полученных композитов для очистки ПЦР-фрагментов, в качестве носителей для твердофазного синтеза олигонуклеотидов, в пробоподготовке при одновременном определении содержания производных водо- и жирорастворимых витаминов в крови человека, а также в качестве рабочих тел в масс-спектрометрии некоторых пептидов. В заключительной части главы представлена наглядная таблица, демонстрирующая области применения разработанных фторполимер- и полианилинсодержащих композитов.

Благодаря комплексному исследованию обнаруженного диссертантом эффекта «негативной селекции» в отношении нуклеиновых кислот в диссертации впервые разработаны оригинальные одностадийные схемы выделения нуклеиновых кислот из биологических проб сложного состава в рамках пробоподготовки при проведении ПЦР-анализа. Используя разработанные технологии, диссертант получил серию композиционных полимерсодержащих сорбционных материалов на основе различных твердых носителей, таких как пористые кремнеземы, стеклянные мультикапилляры, синтетические мембраны, а также разработал линейку биосепарирующих элементов различной конструкции, содержащих полученные сорбенты, предварительно проведя тщательный отбор наиболее технологичных вариантов синтеза полимерсодержащих композитов. Всесторонний анализ результатов исследования свойств разработанных диссертантом материалов позволил дополнительно расширить область их применения для достижения различных биомедицинских целей.

Диссертация Капустина Дмитрия Валерьевича, безусловно, представляет собой серьезный и завершенный научный труд, выполненный на высочайшем теоретическом и экспериментальном уровне. Представленный в диссертации экспериментальный материал получен автором в сотрудничестве с множеством как отечественных, так и зарубежных коллег, и отличается весьма значительным объемом. Достоверность представленных диссертантом теоретических и методических положений, как и экспериментальных результатов, не вызывает сомнений благодаря комплексному и грамотному использованию современных высокочувствительных аналитических методов в сочетании с разнообразными оригинальными воспроизводимыми физико-химическими методами синтеза. Положения и выводы диссертации обоснованы и подтверждены обширным графическим и табличным материалом. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации, которое

исчерпывающе отражено в научных публикациях автора в ведущих рейтинговых зарубежных и отечественных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для опубликования основных результатов диссертации.

Разработанные в докторской диссертации Д.В. Капустина стратегии синтеза и использования композиционных полимерсодержащих сорбентов в молекулярной диагностике и биоаналитике обеспечивают хорошие перспективы для широкого практического применения таких материалов, что приобретает особенно важное значение в современной ситуации глобального распространения нового опасного коронавируса. Предложенные диссертантом методы, подходы и результаты могут быть рекомендованы при составлении лекционных курсов и студенческих практикумов на профильных кафедрах российских ВУЗов, а также при обучении персонала лабораторий клинико-диагностического профиля.

Принципиальных замечаний по представленной диссертации нет. Тем не менее, есть вопросы, которые следует прокомментировать:

1. Перед обсуждением областей применения разработанных материалов и биосепарирующих элементов было бы не лишним провести оценку себестоимости материалов, входящих в состав разработанных диссертантом наборов, по сравнению с диагностическими системами, представленными на рынке.

2. При обсуждении результатов выделения тотальной почвенной ДНК не приведены точные характеристики использованных образцов почвы; также не проведена сравнительная оценка эффективности выделения с помощью разработанной автором системы и с помощью известных коммерческих протоколов.

3. В тексте диссертации встречаются опечатки, которые, впрочем, не искажают смысла изложенного материала и не приводят к неверным толкованиям.

Сделанные замечания носят рекомендательный характер, нисколько не умаляют научной ценности диссертации Д.В. Капустина и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Таким образом, диссертация Капустина Д.В. является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных диссертантом исследований решена научная проблема, имеющая важное хозяйственное значение для развития бионанотехнологий, в частности, молекулярной диагностики, в которых применяются полимерсодержащие композиты, 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 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.

Заведующий лабораторией биологически активных наноструктур отдела генетики и молекулярной биологии бактерий Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации («НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России), доктор биологических наук

Лунин Владимир Глебович

Адрес: 127550, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18.

Тел.: +7 (499) 193-30-01; e-mail: lunin1955@gmail.com

Подпись д.б.н. В.Г. Лунина удостоверяю
Ученый секретарь НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи
к.б.н.

Кожевникова Л.К.
« 28 » августа 2020 г.

