

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента на диссертационную работу Черемискиной Анастасии Алексеевны «Модификация поверхности кремниевого нанопроволочного полевого транзистора для индикации вирусных частиц в реальном времени», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология» (биологические науки)

### **Актуальность темы диссертационного исследования**

На сегодняшний день задача разработки экспрессных методов анализа и диагностики вирусных инфекций, отличающихся высокой доступностью, достаточным уровнем чувствительности и избирательности, занимает одно из приоритетных мест. Ее успешное решение играет важную роль в обеспечении своевременности и эффективности комплекса противоэпидемических и лечебно-профилактических мероприятий. В этой связи разработка биосенсоров является важным направлением современной клинической и лабораторной неинвазивной диагностики. Достоинством биосенсоров является высокая избирательность, чувствительность, экспрессность, малые габариты аналитических устройств. В ряде работ показана высокая чувствительность биосенсоров на основе полевых транзисторов, на поверхности которых имеется кремниевый нанопроволочный проводник, превышающая чувствительность методов поверхностного плазмонного резонанса и атомно-силовой микроскопии. Нанопроволочные биосенсоры могут осуществлять индикацию специфических молекул ДНК/РНК и белков в зависимости от иммобилизованных молекул. В то же время конструкция ряда нанопроволочных биосенсоров имеет определенные недостатки. Автором диссертационной работы проведены не только этапы оптимизации модификации поверхности нанопроволочного биосенсора, но и внесены конструктивные решения.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Диссертация посвящена разработке кремниевого наносенсора для индикации вирусных частиц. Автором постулировано 3 положения, выносимых на защиту, каждое из которых характеризует отдельную часть работы, подкрепленную фактическим экспериментальным материалом. Немаловажно, что положения

включают как методологическую составляющую, так и конкретные количественные характеристики созданных подходов. Перечисленные положения далее раскрываются и обсуждаются в тексте диссертации. Сделанные выводы обоснованы и полностью отражают результаты работы.

### **Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций**

Достоверность и научная новизна проведенных исследований сомнений не вызывают. А.А. Черемискиной разработана новая конструкция опытно-промышленного образца нанопроволочного биосенсора, направленная на упрощение использования электродов заземления. Особенностью предложенной конструкции является интегрирование двух электродов заземления непосредственно на поверхности кристалла микросхемы, что позволяет повысить надежность работы биосенсора и упростить его эксплуатацию. Приоритетность выполненных исследований подтверждена патентом на полезную модель «Биосенсор для индикации биологических частиц» (Патент №215954). Разработанный комплекс позволяет определять знак заряда биологической молекулы на поверхности раздела фаз. Установлено, что, поликлональные антитела обладают близким к нейтральному электрическим зарядом, в то же время, при образовании комплексов «антиген-антитело», знак заряда меняется на отрицательный, что позволяет осуществлять специфическую индикацию вирусных частиц.

### **Теоретическая и практическая значимость результатов**

Показана возможность использования нанопроволочного биосенсора в научных экспериментах для исследования электрических зарядов биологических молекул (антител, антигенов вирусных частиц и их комплексов). Это может помочь изучить фундаментальный механизм взаимодействия вирусных частиц и клетки, биофизические процессы на поверхности биологических частиц.

Изготовлена опытно-промышленная серия разработанных биосенсоров, которые имеют практическое значение в специфической индикации возбудителей вируса гриппа А, коронавирусной инфекции и осповакцины. Практическая значимость подтверждена Актом внедрения в опытно-промышленное производство нанопроволочного сенсора АО «НЗПП Восток» для последующего использования в лабораторной практике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

## **Структура и содержание диссертации**

Диссертация А.А. Черемискиной занимает 132 страницы текста, включает 221 источник, проиллюстрирована 34 рисунками, 10 таблицами, имеет 4 приложения (результаты АСМ, вольт-амперные характеристики, патент, акт внедрения). Раздел «Введение» включает все необходимые подразделы, включая актуальность исследования, цели и задачи, новизну и значимость, положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов и другие формальные пункты.

Обзор литературы посвящен современным иммунологическим, молекулярно-генетическим и микроскопическим методам детекции вирусов, различным методологическим аспектам конструирования биосенсоров и, в частности, нанопроволочных биосенсоров. В целом, обзор литературы содержит достаточный объем информации и предвещает необходимость разработки методического и технологического совершенствования нанопроволочных биосенсоров для детекции вирусов, являющегося целью настоящей работы.

В главе 2 «Материалы и методы» перечислены используемые в работе химические и биологические материалы, включающие штаммы вирусов гриппа А, осповакцины, вирусоподобные частицы SARS-CoV-2 и антитела к ним. Детальное описание методов подготовки вирусных частиц, конструирования биосенсоров и функционализации их поверхности свидетельствует о том, что все эксперименты выполнены А.А. Черемискиной самостоятельно.,

Главы 3, 4 посвящены полученным автором результатам и их обсуждению.

Глава 3 посвящена подбору условий очистки, модификации поверхности нанопроволочных сенсоров с использованием физических и химических способов, функционализации поверхности антителами, выявлению вирусов с использованием сконструированного биосенсора. Показано, что оптимальным способом подготовки поверхности является спиртовая обработка с последующей модификацией поверхности кросс-линкером (3-аминопропил) триэтоксисиланом и активацией NH<sub>2</sub>-групп для ковалентного связывания антител. Для выявления вируса гриппа проводили ковалентное связывание с антителами против гриппа А, для детекции вирусоподобных частиц коронавируса SARS-CoV-2 применяли моноклональные антител, специфичные к S-белку, для определения вируса осповакцины - ПКА, специфичные к данному вирусу. По результатам работы чувствительность

нанопроволочного биосенсора составила  $10^4$  ВЧ/мл для вируса гриппа,  $10^3$  ВЧ/мл для вирусоподобных частиц SARS-CoV-2 и вируса осповакцины.

В главе 4 описаны способы оптимизации конструкции биосенсора с последующей разработкой опытно-промышленных образцов биосенсоров. В диссертационной работе разработана конструкция опытно-промышленного нанопроволочного сенсора с *n*-типом проводимости, направленная на упрощение использования электрода заземления. Особенностью разработанной конструкции является интегрирование двух электродов заземления непосредственно на поверхность кристалла микросхемы. По результатам лабораторных испытаний на примере вируса гриппа птиц установлено, что специфическое взаимодействие вирусных частиц с иммобилизованными поликлональными антителами приводит к изменению вольт-амперных характеристик, что подтверждает возможность использования данного конструкторского решения биосенсора для детекции вирусов.

#### **Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы, полнота опубликования результатов**

Детализация диссертации и автореферата свидетельствует о том, что автором лично и под его руководством проведен заявленный объем исследований и разработок. Личное участие автора выразилось в анализе литературных данных, в разработке топологии нанопроводникового сенсора, планировании и проведении подготовки поверхности сенсора, антител и вирусных частиц, интерпретации результатов, подготовке материалов к публикации в отечественных и зарубежных изданиях. Достоверность результатов сомнений не вызывает, они опубликованы в ведущих научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ (6 статей), из них 3 – в научных изданиях, индексируемых базой данных RSCI, 1 – в издании категории K1; 5 – в изданиях, индексируемых международными базами WoS, Scopus, из них 3 в категории Q2, что удовлетворяет критериям Минобрнауки России №2-ка/1 от 26.10.2022 г. Автором получен патент РФ на полезную модель. Результаты работы доложены на 8 ведущих международных и всероссийских научных конференциях.

#### **Замечания по диссертационной работе**

Принципиальных замечаний к диссертационной работе Черемискиной А.А. нет.

Вопросы дискуссионного характера:

1. Для исследования какого вида вирусосодержащего материала (культуральная жидкость, клинический материал) может быть использован разработанный биосенсор и какие могут быть способы, устраняющие влияние посторонних биологических молекул?
2. Какой параметр может быть использован для интерпретации результатов детекции вирусов с учетом различного содержания вирусных частиц (как в пределах чувствительности метода, так и высоких концентрациях)?
3. Почему для детекции вируса гриппа и SARS-CoV-2/оспывакцины использованы разные аналитические системы и какая система более оптимальная?
4. Какие конструкторские решения могут повысить воспроизводимость и повторяемость нанопроволочных биосенсоров?

**Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней**

Диссертационное исследование отличается актуальностью, новизной, высоким качеством выполненной экспериментальной работы, а также значимыми результатами, полученными при внедрении созданных сенсоров в опытно-промышленное производство, что является закономерным следствием высокого профессионального уровня автора. Автореферат полностью отражает содержание диссертации, тщательно оформлен и хорошо проиллюстрирован. Диссертационная работа Черемискиной Анастасии Алексеевны на тему «Модификация поверхности кремниевого нанопроволочного полевого транзистора для индикации вирусных частиц в реальном времени», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология», является законченной, самостоятельной научно-квалифицированной работой, в которой решена актуальная научная задача, имеющая прикладное значение в нанобиотехнологии и наномедицине, а именно, при разработке нанобиосенсоров для индикации возбудителей вирусных инфекций; изложены новые научно обоснованные технические, технологические или иные решения и разработки. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.6. «Биотехнология» (биологические науки) (п. 9, 14, 22). По объему и методологическому уровню выполненных исследований, научной новизне,

практической значимости, достоверности полученных результатов и выводов диссертационная работа Черемискиной А.А. полностью соответствует требованиям ВАК пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 в действующей редакции, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук., а ее автор, Черемискина Анастасия Алексеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук по специальности 1.5.11. «Микробиология», профессор кафедры микробиологии и физиологии растений биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Уткин Денис Валерьевич

« 30 » 01 2024 г.

Почтовый адрес:

410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Телефон: +79172090525, +7 (8452) 26 - 16 - 96. E-mail: twoduck@yandex.ru, rector@sgu.ru

Подпись Уткина Дениса Валерьевича заверяю:

Ученый секретарь Ученого совета

СГУ, канд. хим. наук



Федусенко Ирина Валентиновна

« 30 » 01 2024 г.