



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ**

«Федеральный исследовательский центр

«Красноярский научный центр

Сибирского отделения

Российской академии наук»

(КНЦ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН)

Академгородок, 50,

г. Красноярск, 660036, Россия

тел.: +7 (391)243-45-12, факс: +7 (391)290-53-78

e-mail: fic@ksc.krasn.ru, <http://ksc.krasn.ru>

ОКПО 05239177, ОГРН 1022402133698

ИНН/КПП 2463002263/246301001

от 13.04.2024 № 02/04-01/79

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФИЦ КНЦ СО РАН
член-корр. РАН, д-р сел.-хоз. наук

Шпедт А.А.

2024 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Черемискиной Анастасии Алексеевны на тему
«Модификация поверхности кремниевого нанопроволочного полевого транзистора для
индикации вирусных частиц в реальном времени», представленной на соискание ученой
степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология

Актуальность темы исследования

Диссертация Черемискиной Анастасии Алексеевны посвящена исследованию методов модификации биологически активными молекулами (далее – рецепторами) поверхности нанопроволочного биосенсора, выполненного на основе кремниевого полевого транзистора (НП-биосенсора) и предназначенного для разработки новых и эффективных способов экспресс-детекции вирусов. Разработка быстрых и точных способов обнаружения вирусных антигенов необходима для проведения вирусологических исследований, постановки диагноза заболевания, определения эффективности и коррекции лечения, обнаружения вирусной контаминации, проведения своевременных санитарно-эпидемиологических работ. В данном направлении перспективным считается использование НП-биосенсора, что обусловлено высокой селективностью и чувствительностью устройства, проведением анализа без

использования меток. Важно отметить, что в процессе детекции происходит электрическая регистрация сигнала в режиме реального времени. Так, адсорбция молекулы-мишени на модифицированную поверхность НП-биосенсора приводит к протеканию специфической реакции между молекулой-мишенью и рецепторами, тем самым вызывая изменение вольт-амперных характеристик устройства.

Качество и эффективность обнаружения вирусного антигена с помощью НП-биосенсора во многом зависит от подбора оптимальных условий проведения модификации его поверхности рецепторами (моноклональными антителами и аптамерами). В связи с этим, актуальность выбранной темы диссертационной работы Черемискиной А.А. не вызывает сомнений.

Основные научные результаты и их значимость для науки и производства

Автором представлены новые данные о знаке эффективных электрических зарядов на поверхности раздела фаз «нанопроволока – исследуемая проба», в частности: комплекс «антитело-вирус гриппа А» обладает отрицательным эффективным зарядом в 1 мМ калий-фосфатном буфере ($\text{pH}=7,4\pm 0,1$);

комплекс «антитело-вирусоподобные частицы коронавируса SARS-CoV-2» обладает отрицательным эффективным зарядом в дистиллированной воде ($\text{pH}=5,9\pm 0,1$);

поликлональные антитела, специфичные к вирусу осповакцины, имеют эффективный заряд, близкий к нейтральному, в деионизованной воде ($\text{pH}=5,9\pm 0,1$). Результат имеет важное методическое и практическое значение для разработки методов и средств модификации и функционализации НП-биосенсоров, с учетом их зависимости от молекулярных и физико-химических характеристик объекта и среды исследований (детекции и диагностики)

Кроме этого, в работе исследована и показана практическая возможность использования электростатического взаимодействия антител с молекулами кросс-линкера. Предлагаемое решение позволяет существенно сократить как временные, так и материальные затраты на проведение процедур модификации поверхности НП-биосенсора при использовании моноклональных антител в качестве его рецепторов к исследуемым биомишеням.

В диссертационной работе получены экспериментальные данные, которые могут найти применение для разработки практических методик детекции вирусов. Эксперименты детекции вирусных частиц (далее – ВЧ) показали, что НП-биосенсор детектирует целевые частицы с чувствительностью $\sim 10^3\text{-}10^4$ ВЧ/мл. При этом существенно что предлагаемые методы в силу их простоты и доступности в реализации,

конечно при соответствующей адаптации, могут быть использованы и для контроля качества экспериментального изготовления и промышленного производства НП-биосенсор.

Автором оптимизирована конструкция НП-биосенсора посредством интегрирования электродов заземления на поверхность кристалла, что позволяет упростить процедуру детекции и сохранить работоспособность конструктивных элементов устройства при анализе малого объема исследуемой пробы ($V \sim 10$ мкл). Кроме этого предложенное решение обеспечивает возможность его использования в разработке микрофлюидных систем диагностики.

Существенно что детальная и тщательная проработка экспериментальных данных позволила автору выявить, необходимость как междисциплинарных фундаментальных (биомолекулярные, электро-химические, физико-технические аспекты взаимодействия биоаналитов с рецепторами НП-биосенсора) так и технико-технологических направлений исследования (конструктивные физико-технические разработки обеспечивающие воспроизводимость получения рецептора НП-биосенсора и перспективы перехода от детекции к количественной диагностике).

Безусловно, полученные данные имеют фундаментальное и практическое значение для науки и практики. Они внесли методический и фактический вклад в изучение механизмов электрохимических аспектов взаимодействия антител с вирусными антигенами, которые при практической реализации позволят привести к уменьшению материальных и временных затрат на проведение экспериментов.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и заключений

Положения и выводы диссертационной работы являются научно обоснованными. Результаты являются достоверными и опираются на экспериментальные и литературные данные. В работе использованы разнообразные методы исследования, получен большой объем экспериментального материала, использованы методы статистической обработки. Анализ и интерпретация результатов выполнены грамотно и позволяют сделать обоснованные выводы и заключения.

Работа прошла широкую апробацию на российских и международных конференциях, а ее результаты отражены в 6 публикациях в рецензируемых изданиях.

Общая оценка работы

Диссертационная работа Черемискиной А.А. построена по классической схеме. Она состоит из введения, 4-х глав, заключения, выводов и списка используемой литературы, включающего 221 источник. Работа изложена на 132 страницах, содержит 34 рисунка, 10 таблиц, 4 приложения.

Материал изложен последовательно, логично и аргументировано. По материалам диссертационной работы опубликовано 6 научных статей в рецензируемых российских и зарубежных журналах, 3 из которых включены в перечень Высшей аттестационной комиссии, 10 тезисов в трудах научных конференций, патент на полезную модель.

Во введении обоснована актуальность исследования, сформулированы цели и задачи, а также представлены положения, которые автор выносит на защиту.

В главе «Обзор литературы» приведен развернутый обзор литературных данных о существующих разнообразных методах детекции вирусов, проанализированы различные варианты биосенсоров – высокочувствительных аналитических устройств, которые используют специфические биохимические реакции с целью обнаружения биологических или химических соединений. Среди прочих вариантов рассмотрен нанопроволочный биосенсор, его структура, принцип действия, а также его характеристики. Проведенный анализ литературных данных выявил проблемы использования НП-биосенсоров для детекции биологических молекул, в частности, вирусов. Эти проблемы связаны с подготовкой анализируемых проб, оценкой возможности использования той или иной методики модификации поверхности НП-биосенсора, оптимизации самой процедуры проведения анализа, а также с необходимостью правильного выбора конструкции устройства. Исходя из этого, сформулированы цель и задачи диссертационной работы.

В главе «Материалы и методы» представлен перечень основных химических реактивов, материалов и оборудования. Отмечено, что исследования велись с привлечением методов электронной, атомно-силовой и оптической микроскопии. Приводится конструкция нанопроволочного сенсора, который использовался в работе. Детально описаны пробоподготовка вирусоподобных частиц коронавируса SARS-CoV-2, вируса осповакцины (штамм Л-ИВП), функционализация поверхности и иммобилизация рецепторов для выполнения детекция вируса гриппа А (подтип А(H1N1)pdm09), вирусоподобных частиц коронавируса SARS-CoV-2, вируса осповакцины (штамм Л-ИВП).

В главе «Результаты и обсуждения» приводятся результаты проведенных экспериментов и их детальное обсуждения. Представление результаты пробоподготовки

поверхности подтверждаются фотографиями атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевой пластины до этапов модификации, после физической жидкостной и химической жидкостной обработок, функционализации поверхности молекулами кросс-линкера. В главе приведены электронные фотографии вируса гриппа А (подтип А(Н1N1)pdm09), вирусоподобных частиц коронавируса SARS-CoV-2, а также вируса осповакцины штамм (Л-ИВП), которые доказывают, что исследование действительно велось с указанными патогенами, а также показывают наличие посторонних белков. Результаты детекции вирусных частиц представлены в виде сенсограмм или временных зависимостей тока НП-биосенсора.

В главе «Оптимизация конструкции биосенсора» представлена разработанная конструкция устройства с двумя интегрированными электродами заземления. Проведены исследования работоспособности микросхем, произведенные на АО «Новосибирском заводе полупроводниковых приборов Восток».

Заключение подводит итоги проделанной работы, определяет дальнейшие перспективы ее развития.

Диссертационная работа Черемискиной Анастасии Алексеевны «Модификация поверхности кремниевого нанопроволочного полевого транзистора для индикации вирусных частиц в реальном времени» представляет собой законченное научное исследование. Она полезна, как с теоретической, методической так и практической точек зрения. Практическая направленность работы не вызывает сомнений, что подтверждается патентом, а также актом внедрения. Материал изложен последовательно, логично и аргументировано.

В целом диссертация производит хорошее впечатление, иллюстрирована интересными фотографиями, объективно отражающими наличие вирусов в исследуемой суспензии и на поверхности биосенсора. В диссертационной работе Черемискиной А.А. комплексно рассматривается широкий круг вопросов, связанных, как с разработкой методик, так и с решением технических проблем. Существенно также, что в автор установил знак эффективного электрического заряда биологических молекул на поверхности раздела фаз «нанопроволока-исследуемая жидкая проба». «Антитело-вирус гриппа А» обладает отрицательным эффективным зарядом в 1 мМ калий-фосфатном буфере ($pH=7,4\pm 0,1$), «антитело-вирусоподобные частицы коронавируса» обладает отрицательным эффективным зарядом в дистиллированной воде ($pH=5,9\pm 0,1$), поликлональные антитела, специфичные к вирусу осповакцины (штамм Л-ИВП), имеют эффективный заряд, близкий к нейтральному в деионизованной воде ($pH=5,9\pm 0,1$).

Полученные экспериментальные результаты представляют важную информацию как для фундаментальной науки, так и для практической биотехнологии. Работа в целом носит междисциплинарный характер, поэтому большое количество использованной литературы не случайно. Автор использует положения биотехнологии, физики, математики, статистического анализа экспериментальных результатов, химии, вирусологии, клеточной технологии, радиотехники. Анализ авторских публикаций указывает на последовательную эволюцию исследований – от методов очистки поверхности биосенсора, пробоподготовки исследуемой суспензии до детекции вирусов и разработки оригинальной конструкции биосенсора.

Работа выполнялась в тесном сотрудничестве с: Федеральным государственным бюджетным научным учреждением науки Институтом физики полупроводников им. А.В.Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук, Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича», АО «Новосибирский завод полупроводниковых приборов Восток».

Замечания

В качестве недостатков исследований можно отметить следующее:

1. В главе 3 автор не указывает относительную погрешность концентрации вирусов в исследуемых суспензиях. При этом в тексте диссертации полностью опущена информация о погрешности метода детекции вирусов с помощью НП-биосенсора. Стоило бы привести сравнение чувствительности разрабатываемого метода детекции с широко распространёнными ПЦР или ИФА. Такая информация представляет определенную ценность для дальнейшего развития метода.

2. Представленные величины уровня значимости на рисунке 34 (94 стр.) вызывают сомнения. Например, на рисунке приведены данные $p=0,001536$, $p=0,009258$ и т.д.

3. Для полноты экспериментов не хватает контроля специфичности сигнала при детекции вирусоподобных частиц SARS-CoV-2.

4. В диссертационной работе все эксперименты проведены на модельных буферах, содержащих только исследуемые мишени, однако в биологических жидкостях, содержится большое количество различных белков, бактерий и вирусов, поэтому результаты могут кардинально отличаться, в дальнейших исследованиях необходимо отработать детекцию вирусов в реальных условиях.

5. Результаты детекции вирусных частиц представлены в двух различных графиках: сенсограммы и временные зависимости величины тока в цепи исток-сток. Для облегчения понимания стоило бы представить результаты в одинаковых типах графиков.

6. Также в тексте диссертации и автореферата присутствуют неизбежные опечатки и неточности. Например,

– физическая сорбция (95 стр.), хотя в тексте использовалась физическая адсорбция;

– на кремниевых платинах (на стр. 53, 62, 67) хотя очевидно, что правильно писать пластины, а это просто опечатка;

– название таблицы 6 «Условия модификации поверхности НП-биосенсора молекулами кросс-линкера» (54 стр.), хотя из текста следует, что в таблице представлены условия функционализации поверхности.

– перепутан номер рисунка (68 стр.). В тексте диссертации указано «...Как видно из рисунка 16, в целом поверхность однородна...», хотя речь идет о рисунке 17.

Указанные замечания не являются принципиальными и не влияют на достоверность результатов и обоснованности сделанных выводов.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат составлен с соблюдением установленных требований и достаточно полно отражает содержание диссертации.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

Основные результаты, изложенные в диссертации, представлены в 6 научных статья в рецензируемых изданиях, 10 тезисах российских и международных конференций, в 1 патенте РФ на полезную модель.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Считаем необходимо продолжить работу в направлении разработки методов детекции антигена, специфических белков и маркеров в крови пациентов, например, при инфекционных заболеваниях, онкологии, пищеварительной системы человека.

Считаем целесообразным обратить внимание на перспективность разработки сенсоров и методов детекции вирусов в полевых условиях с помощью портативного устройства регистрации (детекции).

Заключение

Диссертационная работа Черемискиной Анастасии Алексеевны «Модификация поверхности кремниевого нанопроволочного полевого транзистора для индикации вирусных частиц в реальном времени» представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу на актуальную тему. Новые научные результаты, полученные диссертантом, имеют существенное значение в области биотехнологии, разработки медицинских приборов и методов диагностики, понимания на качественном уровне ранее не известных фундаментальных электрических свойств вирусов и белков, а также их специфических комплексов с комплементарными моноклональными антителами и молекулярными крослинкерами на границе раздела фаз в НП-биосенсоре.

Выводы и рекомендации, представленные в диссертации, достаточно обоснованы. Работа отвечает требованиям пп. 9 - 14 Положения «О присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями в ред. Постановления Правительства Российской Федерации №426 от 20.03.2021), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология.

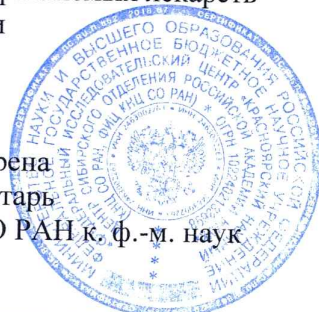
Отзыв заслушан и обсужден на семинаре лаборатории цифровых управляемых лекарств и тераностики Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (протокол №.1 от 16 января 2024 г.)

Отзыв составила:
заведующая лабораторией
Цифровых управляемых лекарств
и тераностики

Анна Сергеевна Кичкайло

«13» 01 2024 г.

Подпись заверена
Ученый секретарь
ФИЦ КНЦ СО РАН к. ф.-м. наук



Шкуряев П.Г.

Сведения об организации:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН)

Почтовый адрес: 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, 50

Тел.: +7 (391) 243-45-12

E-mail: fic@ksc.krasn.ru