

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора Владимцевой Ирины Владимировны на диссертационную работу Гаркуша Юлии Юрьевны на тему «Биотехнология производства композиционных органокремнеземных магноиммуносорбентов и их применение для детекции возбудителей особо опасных инфекций», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**Актуальность темы диссертационной работы.** В настоящее время на фоне пандемии вирусной инфекции, жертвами которой стали десятки миллионов людей в мире, особую актуальность приобретают научные исследования, посвященные разработке и внедрению высокоэффективных диагностических и индикационных технологий. Иммуносорбционные методы, благодаря высокой чувствительности и специфичности, давно и прочно зарекомендовали себя в качестве основных при конструировании препаратов для диагностики и индикации возбудителей заболеваний бактериальной и вирусной природы. Применение иммуносорбции в сочетании с магнитоуправляемостью открыло новые перспективы использования иммобилизованных микробиологических систем, позволило упростить методы иммунодиагностики, автоматизировать и масштабировать мониторинг инфекционных агентов во внешней среде. Несмотря на значительное количество работ, посвященных магнитной иммунной сепарации, в настоящее время реализована лишь часть потенциальных возможностей данного направления. Особо важное значение имеют разработки, посвященные стандартизации технологических процессов получения магноиммуносорбентных препаратов, поскольку они способствуют внедрению научных технологий в практическое здравоохранение. Вышесказанное позволяет заключить, что диссертационную работу Ю.Ю. Гаркуша следует отнести к весьма актуальным научным исследованиям.

**Научная новизна** прослеживается на всех этапах диссертационной работы: впервые проведена стандартизация технологии производства и создан стандартный образец магноиммуносорбентного препарата на основе алюмосиликатного носителя, который использован для конструирования магноиммуносорбентной тест-системы для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе; разработана новая технология проведения магнитной сепарации патогена путем его десорбции с

последующей идентификацией методами иммунодиагностики; предложена отличающаяся новизной методика получения туляремийного иммунопероксидазного конъюгата и способ его консервации; созданы новые технические устройства с применением магноиммуносорбентов для отбора материала в труднодоступных местах или в загрязненных, большеобъемных средах. Новизна исследований соискателя подтверждена пятью патентами РФ на изобретения и полезные модели (№2652231, №2535070, №2549971, №125976, №133834).

**Обоснованность и достоверность результатов** исследования Ю.Ю. Гаркуша базируется на теоретических и экспериментальных данных, полученных в результате использования современной научной методологии. Диссертационная работа основана на данных многолетних исследований, проведена на большом объеме экспериментального и полевого материала и проверена при комиссионных испытаниях на базе трех учреждений Роспотребнадзора и Минсоцразвития России. Полученные соискателем экспериментальные результаты обработаны по стандартным программам вариационной статистики.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные соискателем результаты важны для разработки научных основ иммунодиагностики и методов магнитной сепарации, индикационного мониторинга, оценки состояния природных очагов особо опасных инфекций. Особо следует подчеркнуть практическое значение проведенных научных исследований, направленных на стандартизацию и коммерциализацию магноиммуносорбционных технологий и расширение ассортимента методических приемов и средств диагностики инфекционных заболеваний и индикации возбудителей. Практическую значимость диссертационной работы подтверждают разработанные с участием диссертанта пакеты нормативных документов, утвержденные как на учрежденческом, так и на федеральном уровнях, которые являются свидетельством реализации научных разработок автора.

**Апробация и публикация результатов научного исследования** проводилась планомерно с 2010 по 2018 г.г. Материалы диссертации Ю. Ю. Гаркуша были представлены на шести Всероссийских и одной Международной научно-практических конференциях, в 25 публикациях, 5 из которых рекомендованы ВАК РФ для диссертационных работ.

### **Оценка оформления, содержания и завершенности диссертации**

Диссертация Ю. Ю. Гаркуша оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к такого рода работам. Она изложена на 197 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, перечня сокращений, условных обозначений, символов и единиц, списка литературы из 178 отечественных и 59 зарубежных источников, и 7 приложений.

Во введении соискатель формулирует актуальность своей работы, степень разработанности темы, цель и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, приводит основные положения, выносимые на защиту. Здесь же приведены материалы и методы исследования. Объем материалов, взятых для экспериментального и полевого исследования, довольно обширен (29 штаммов микроорганизмов и 1519 экземпляров клещей). Широкий спектр использованных в работе микробиологических, иммунологических, биологических, физико-химических и биохимических методов свидетельствует о высокой методической квалификации диссертанта. Следует отметить современное, с высокой разрешающей способностью, оборудование, например, атомно-силовую микроскопию на зондовом микроскопе SPM-9600 (фирмы Shimadzu, Япония).

Первая глава диссертации «Обзор литературы» (38 стр.), состоящая из 4 разделов и заключения, является аналитическим исследованием значительного числа литературных источников, написана в соответствии с логикой рассмотрения интересующих автора проблем.

Разделы 1.1 и 1.2 данной главы посвящены характеристике различных типов сорбентов, используемых для научных и практических целей, обоснованы преимущества применения магнитных микрогранулированных носителей на основе кремнеземов при конструировании тест-систем для лабораторной диагностики инфекционных заболеваний и санитарно-эпидемиологического мониторинга. Разделы содержат качественные иллюстрации (микрофотографии, рисунки и схемы).

В небольшом по объему разделе 1.3 обсуждены возможности десорбции биомолекул с твердофазной матрицы. Заключительный раздел литературного обзора содержит подробную характеристику морфологии, физиологии и эпидемиологии основного выбранного диссертантом биологического объекта – возбудителя туляремии. На наш взгляд, часть приведенного материала является излишней, например, характеристика заболеваемости туляремией 3-4-х летней давности.

В целом следует отметить, что анализ литературных источников, проведенный диссертантом, достаточно четко обосновывает необходимость исследований по выбранному автором направлению.

Результаты собственных исследований диссертанта начинаются с главы 2 (25 стр.), посвященной результатам стандартизации биотехнологии производства коммерческих органокремнеземных магноиммуносорбентов.

В обширном по объему разделе 2.1 подробно описаны условия получения и характеристика стандартного образца магноиммуносорбента на основе модифицированного алюмосиликата. Полученные результаты иллюстрированы качественными микрофотографиями, рисунками, таблицами и графиками.

В разделе 2.2. «Разработка системы контроля качества МИС» приведена составленная автором подробная постадийная схема, в которой определены необходимые при производственном масштабе технологии контрольные точки для различных операций процесса получения стандартного образца магносорбента. Здесь же представлено описание технологии его приготовления вплоть до фасовки, упаковки и маркировки готового продукта, приведены критерии стабильности аттестуемых показателей экспериментальных серий препарата.

Раздел 2.3 содержит сведения по разработке диссертантом пакета нормативной документации на технологию получения стандартного образца магноиммуносорбента, которая на основании межлабораторных комиссионных испытаний экспериментально-производственных серий препарата была одобрена Ученым советом, утверждена директором ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» и зарегистрирована в реестре стандартных образцов этого учреждения.

Третья глава диссертации (29 стр.) посвящена разработке производственной технологии получения магноиммуносорбционной тест-системы для проведения иммуноферментного анализа и ее практическому использованию при лабораторной диагностике туляремии и индикации возбудителя. Диссертантом приведены методики получения биологического сырья: специфических антигенов, туляреминой антисыворотки (раздел 3.1.1), диагностических иммуноглобулинов (раздел 3.1.2) и конструирования магноиммуносорбентной тест-системы для выявления туляреминого микроба в ИФА (раздел 3.1.3). Представлены подробные схемы технологических процессов, определены границы чувствительности и специфичности тест-системы при лабораторных исследованиях и на модельных пробах зараженных возбудителем туляремии объектов окружающей среды. О практической значимости проведенной соискателем

работы свидетельствует разработка и внедрение состоящего из 12 компонентов препарата «Набор реагентов тест-системы иммуноферментной магноиммуносорбентной для выявления возбудителя туляремии», которая успешно прошла комиссионные испытания на базе трех учреждений Роспотребнадзора и Минсоцразвития России и была допущена к обращению на территории Российской Федерации. Особо отметим проведенные Ю. Ю. Гаркуша испытания полученных препаратов в полевых условиях (раздел 3.2) при поиске туляремийного антигена в Ставропольском крае в процессе исследования потенциальных переносчиков инфекции – иксодовых клещей. На выборке из 1519 экземпляров клещей показана высокая эффективность разработанных препаратов, увеличение вероятности положительного результата и достоверность отрицательного результата анализа.

В следующем разделе 3.3 диссертации содержатся весьма интересные сведения о разработке с участием диссертанта двух технических устройств для проведения эпидмониторинга объектов окружающей среды на наличие инфекционного патогена. Основой первой установки служит магнитная ловушка, селективно концентрирующая микроорганизмы из открытых водных источников с помощью микрогранулированного магноиммуносорбента. При этом создаются условия для извлечения инфекционного агента, находящего в водной среде даже в минимальной концентрации. В отличие от используемых ранее вариантов магнитных ловушек устройство сконструировано в виде плавающей радиоуправляемой модели для динамического отбора проб воды. Второе устройство представляет собой укладку для транспортировки биологических проб с обеспечением биологической безопасности и сохранением нативности микробиологического объекта. К сожалению, автор не привел иллюстрации (фото, схему или рисунок) данной разработки. Приоритетность и новизна описанных технических устройств подтверждена патентами РФ на полезные модели (№125976 и №133834).

Материал, представленный в четвертой главе диссертации, посвящен описанию нового варианта использования магноиммуносорбента для диагностических или индикационных целей. Особенностью разработанного метода является десорбция инфекционного патогена после его селективного извлечения и концентрирования на иммуномагнитной матрице с последующим обнаружением другими методами анализа (от простых, доступных, таких, как РНГА, до более сложных, например, молекулярно-генетических). Метод отличается новизной (защищен патентом на изобретение РФ № 2535070) и практической значимостью, на него оформлен

и утвержден пакет нормативной документации. Хочу подчеркнуть значимость данной методики для малых лабораторий, работы в полевых условиях и эпидотрядах: в тех случаях, когда может быть недоступна сложная аппаратура для выявления патогена. Кроме того, автором доказано сохранение иммуносорбционных свойств препарата после элюции антигена, что дает возможность его многократного использования.

Каждую из глав диссертации соискатель закончил разделом «Заключение».

Следует отметить тщательность планирования экспериментов, наличие множества схем, поясняющих этапы разработанных технологий, подробный анализ результатов и адекватность сделанных на их основе выводов.

В разделе «Заключение» соискатель обобщил данные теоретических и экспериментальных исследований и акцентировал внимание на наиболее важных результатах своей работы. Выводы (6) соответствуют представленным материалам и отражают конкретные результаты работы.

Завершает диссертационное исследование перечень наиболее важных практических рекомендаций и формулировка перспектив дальнейшей разработки темы.

В тексте прослеживается значительный личный вклад автора, даются ссылки на разработанные другими учеными теоретические и методические материалы и указываются этапы работы, выполненные совместно с другими сотрудниками ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» и Северо-Кавказского Федерального университета.

### **Вопросы, пожелания, замечания по диссертационной работе:**

1. В главе 1 «Обзор литературы» желательно было уделить больше внимания проведенным ранее научным работам, посвященным лабораторной диагностике и эпидемиологическому мониторингу с использованием иммуномагнитных сорбентов, в том числе в методах иммуноферментного анализа. Эти данные можно было бы представить, сократив литературные источники, посвященные типам сорбентов (раздел 1.1) или характеристике туляремийного микроба (раздел 1.4).

2. Диссертация - единая, целостная работа, поэтому, на наш взгляд, дополнительная формулировка цели и задач для исследований, приведенных в главе 2, является излишней.

3. На стадии сухого размола магносорбента в планетарной микромельнице (стр. 71 и 77) рекомендовано использование очень небольшой массы микрогранул (оптимально - 3 г), что ограничивает

получение значительных количеств препарата. Возможно ли масштабирование процесса механического измельчения и какое, на ваш взгляд, оборудование может быть применено для этой цели?

4. Непонятно противоречие между равномерно рассеянными магнитными частицами без признаков конгломерации при просмотре в автоматическом счетчике частиц (рис. 11) и явными конгломератами микрочастиц при микроскопическом исследовании (рис. 16 и 21). Влияет ли образование конгломератов на сорбционную емкость и активность магноиммуносорбентов?

5. Почему на стадии иммобилизации иммуноглобулинов на магносорбент (стр. 74 и 80) использовали фильтрование, а не магнитную сепарацию?

6. Чем объясняется разница на 1-2 порядка в чувствительности иммуноферментной магноиммуносорбентной тест-системы? В результатах исследований, приведенных в главе 3 (разделы 3.1, 3.2, 3.4), эта величина составляет  $1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$  м.к./мл, а в выводах указана чувствительность тест-системы 10 м.к./мл.

7. В автореферате следовало хотя бы кратко изложить особенности технических устройств для эпидмониторинга объектов окружающей среды, разработанных с участием диссертанта. Данный раздел представлен в автореферате только одним предложением и указан в выводах по диссертационной работе.

Приведенные выше замечания носят рекомендательный характер, не являются принципиальными и не умаляют достоинств диссертационной работы.

## **Заключение**

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Юлии Юрьевны Гаркуша на тему «Биотехнология производства композиционных органокремнеземных магноиммуносорбентов и их применение для детекции возбудителей особо опасных инфекций» является законченной научно-квалификационной работой, посвященной актуальной проблеме совершенствования методов лабораторной диагностики и индикации инфекционных патогенов, выполнена на современном методическом уровне, содержит новые, научно обоснованные технологические решения, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие медицинской микробиологии и биотехнологии.

Диссертация Юлии Юрьевны Гаркуша «Биотехнология производства композиционных органокремнеземных магнитоиммуносорбентов и их применение для детекции возбудителей особо опасных инфекций», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований соответствует требованиям п. 9 действующего «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г., № 842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 24.04.2016 г., № 335, от 02.08.2016 г. №748, от 29.05.2017 г., №650, от 28.08.2017 г. №1024, от 01.10.2018 г. № 1168 ), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Юлия Юрьевна Гаркуша заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

#### Официальный оппонент

Доктор биологических наук по специальности 03.00.23 - биотехнология, профессор, профессор кафедры «Промышленная экология и безопасность жизнедеятельности» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный технический университет»; 400005, г. Волгоград, просп. им. Ленина, д. 28; тел.: +7 (937)741-44-54; e-mail: alexvlad32@yandex.ru

Владимцева Ирина Владимировна

11.01.2021 г.

