

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

Важным направлением бионанотехнологии является разработка новых способов пробоподготовки, способных обеспечить высокую чувствительность молекулярно-диагностических методов. В качестве примера можно привести повышение выхода высокоочищенных препаратов биополимеров, в частности, нуклеиновых кислот, при их выделении из биологических проб сложного состава. Если ранее в протоколах пробоподготовки в первую очередь формулировались требования к выходу и чистоте выделяемого биополимера, то сегодня в дополнение к этому требуется сокращение длительности и упрощение процедуры выделения целевого продукта.

Известные методы выделения биополимеров из биологических смесей многостадийны, трудоемки и часто сопровождаются значительными потерями выделяемого биополимера. Автором предложен новый – одностадийный – способ выделения биополимеров, согласно которому образец наносится на специально подготовленный сорбент, не взаимодействующий с биополимером. Последний выходит в исключенном объеме, при этом прочие компоненты смеси (образца) удерживаются сорбентом и затем контролируемо удаляются при пропускании подходящего элюента (или элюентов). Эффективность выделения целевого биополимера может достигать практически 100%.

В ходе выполнения работы автор разработал методы модификации традиционных сорбентов полимерами, которые обеспечили выход нуклеиновых кислот в исключенном объеме (эффект «негативной селекции» в терминологии автора), исследовал физико-химические и сорбционные свойства полученных материалов, предложил оптимальные конструкции биосепарирующих элементов в качестве альтернативы хроматографическим колонкам и разработал оптимальные протоколы пробоподготовки для работы с биосепарирующими элементами. Сказанное выше свидетельствует об **актуальности** темы работы, **оригинальности** предложенного экспериментального подхода и практической **значимости** полученных результатов.

Диссертация включает введение, пять глав с обзором литературы и обсуждением полученных автором результатов, выводы и библиографический список из 439 наименований; работа изложена на 382 страницах и содержит 36 таблиц и 127 рисунков.

В обзоре литературы (Глава 1) рассмотрены методы выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов и физико-химические процессы, лежащие в основе этих методов.

Обсуждены носители, применяемые для получения композиционных сорбентов: традиционные – кремнеземы и синтетические мембраны, и перспективные – стеклянные мультикапилляры. Особое внимание уделено обсуждению методов синтеза композиционных сорбентов для разделения компонентов сложных биологических смесей. В целом, представленный обзор литературы отражает развитие синтетических методов синтеза сорбентов, что позволило автору обосновать выбор использованных в работе носителей и полимерных модификаторов.

Полученные автором результаты представлены в четырех главах. Автор начинает с описания объектов исследования, в том числе носителей, полимерных модификаторов, исходных низкомолекулярных соединений и биологических образцов, приводит разработанные им методы синтеза композиционных полимерсодержащих материалов и схемы экспериментальных установок. Здесь же дается описание методов исследования физико-химических и сорбционных свойств композиционных материалов.

В следующей главе представлены результаты комплексного исследования сорбционных свойств полимерных покрытий. Используя в качестве полимерных модификаторов различные по химической структуре полимеры – фторсодержащие, полиарамиды и полианилины, автор показал, что модифицированные этими полимерами материалы не удерживают двунитевую ДНК, крайне слабо удерживают одонитевую РНК и обратимо удерживают молекулы белков. Этот принципиальный результат позволил автору впервые реализовать на практике одностадийное выделение нуклеиновых кислот из биологических смесей сложного состава. Полимерные покрытия были охарактеризованы комплексом современных методов анализа: рентгеновской фотоэлектронной спектроскопией, сканирующей зондовой микроскопией, спектрально-корреляционной интерферометрией и др. Полученные данные подтвердили вывод автора о том, что эффект «негативной селекции» в отношении ДНК может быть реализован на покрытиях из различных по химическому составу и структуре полимеров. Сопоставление данных, полученных при исследовании статической и динамической сорбции биополимеров на полимерных покрытиях, показало, что эффективность сорбции нуклеиновых кислот и белков определяется суммарным вкладом различных механизмов сорбции, включая гидрофобные и диполь-дипольные взаимодействия, а также образование водородных связей.

Далее автор подробно описывает разработанные им способы синтеза полимерсодержащих композитов – сорбентов для разделения смесей биополимеров и физико-химические свойства полученных полимерных покрытий. Автор разделил способы синтеза композитов на две группы. Первая включает способы, в которых композит получали путем полимеризации подходящего мономера в присутствии неактивированного носителя. К их числу относятся получение ПАНИ-содержащих композитов через химическое осаждение

полимерного нанопокрyтия и нанесение олигомерного/полимерного прекурсора на поверхность носителя методом «кастинга» с последующей иммобилизацией в результате химического отверждения. Отдельного внимания заслуживает разработанный автором способ фторирования слоя олигобутадиена нанометровой толщины, предварительно нанесенного на поверхность частиц объемно-пористого кремнезема. Для фиксации слоя использовали его обработку парами дифторида ксенона, что инициировало одновременное протекание двух процессов: сшивку макромолекул и фторирование полимерной фазы на поверхности носителя.

Вторая группа включает способы синтеза композитов на активированной поверхности носителя. Для активации поверхности ее предварительно модифицировали полисульфокислотами или обрабатывали озоном. Для полимеризации анилина использовали носители, модифицированные гидрофобизованным фторсодержащим полимером; такой способ позволил существенно повысить выход полианилина и технологичность всего процесса получения полимерсодержащего композита.

В последней главе рассмотрены различные варианты практического применения разработанных композитов в составе различных биосепарирующих элементов, особенности конструкций которых также обсуждаются. Обсуждены результаты пробоподготовки для проведения ПЦР-диагностики при одностадийном выделении нуклеиновых кислот из разных источников: бактерий, грибов, вирусов, растений, животных и человека, полученных из урогенитальных мазков, лизатов крови и плазмы, пищевых и косметических продуктов, экстрактов почвы и проч. В дополнение к этому представлены данные по использованию композитов для очистки ПЦР-фрагментов, в качестве носителей для твердофазного синтеза олигонуклеотидов, сорбентов для определения содержания витаминов в крови человека и «рабочих тел» в масс-спектрометрии некоторых пептидов. В заключении главы приведена наглядная таблица, демонстрирующая широту областей применения разработанных фторполимер- и полианилинсодержащих композитов.

Благодаря комплексному исследованию эффекта низкой сорбционной активности ряда полимеров (фторполимеры, полианилины, полиарамида) по отношению к ДНК при одновременной высокой сорбционной активности этих полимеров по отношению к белкам автору удалось разработать оригинальные одностадийные схемы выделения ДНК, непосредственно пригодных для ПЦР-анализа, и предложить широкий спектр применений полученных композитов для иных биомедицинских целей. Автором получена серия композиционных сорбентов (фторполимер-, полианилин- и полиарамид-модифицированных) на основе твердых носителей – пористых и непористых, неорганических и органических, и разработана линейка эффективных биосепарирующих элементов различной конструкции.

На множестве примеров автор убедительно подтвердил высокую эффективность и даже универсальность применения разработанных им биосепарирующих элементов в молекулярной диагностике – для одностадийного выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов, различающихся по происхождению, источнику и способу подготовки. Кроме того, автору удалось показать возможность использования разработанных им материалов и методов в других областях биотехнологии.

Таким образом, диссертационная работа Капустина Дмитрия Валерьевича, безусловно, представляет собой серьезный завершённый научный труд, выполненный на высочайшем экспериментальном и теоретическом уровне. В работе представлен многоплановый экспериментальный материал, полученный автором в сотрудничестве со множеством отечественных и зарубежных коллег.

Достоверность теоретических и методических положений представленной диссертационной работы и полученных автором экспериментальных результатов не вызывает сомнений. Она подтверждается умелым использованием различных синтетических методов в сочетании с чувствительными аналитическими и молекулярно-диагностическими методами исследования. Представленные в диссертации выводы обоснованы. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации, которое исчерпывающе отражено в научных публикациях автора в ведущих зарубежных и отечественных рецензируемых журналах, рекомендованных для опубликования основных результатов диссертации.

Разработанная в докторской диссертации Д.В.Капустина стратегия создания полимерсодержащих композиционных сорбентов обеспечивает хорошую перспективу для практического применения таких материалов, особенно принимая во внимания современную ситуацию с распространением нового опасного коронавируса. Предложенные в диссертации подходы и методы могут быть использованы в лекционных курсах и в студенческих практикумах на профильных кафедрах российских университетов и в лабораториях клинко-диагностического профиля.

По работе есть несколько замечаний:

1. В диссертации было бы уместно дать сравнительную оценку эффекта от использования разработанных композитов/биосепарирующих элементов и существующих на рынке диагностических систем (например, по себестоимости использованных материалов).

2. При обсуждении результатов выделения ДНК из образцов почв не приведены исчерпывающие характеристики использованных образцов и не дана сравнительная оценка эффективности выделения с помощью разработанной автором системы по сравнению с существующими протоколами.

3. В работе следовало подробнее остановиться на чувствительности разработанного автором метода (минимальной концентрации детектируемого вещества).

Указанные замечания нисколько не умаляют научной ценности диссертации Д.В. Капустина, не влияют на общее впечатление от работы и носят рекомендательный характер.

Таким образом, диссертация Капустина Дмитрия Валерьевича является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором 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 Д.В.Капустина полностью соответствуют 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
заведующий кафедрой высокомолекулярных соединений
Химического факультета Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего образования
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ)
чл.-корр. РАН, доктор химических наук, профессор

Ярослав Александр Анатольевич

Адрес: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, корп. 40.

Тел.: +7 (495) 939-55-83; e-mail: yaroslav@genebee.msu.ru

