



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
(БАШГУ)

ул. Заки Валиди, д. 32, г. Уфа, РБ, 450076
тел. 8 (347) 272-63-70, факс (347) 273-67-78
e-mail: rector@bsunet.ru

Утверждаю:

Проректор по научной работе
Федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего
профессионального образования
«Башкирский государственный
университет»,
доктор химических наук, профессор
Захаров Вадим Петрович

« 21 » сентября 2015 года

от « ___ » _____ 201__ г. № _____
на № _____ от _____

Отзыв ведущей организации

на диссертацию Малышевой Натальи Николаевны «Разработка иммуносенсора для определения *Escherichia coli* и антигена вируса кори с использованием нанокompозитов на основе Fe_3O_4 » на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

Пути повышения селективности методик определения в аналитической химии, как известно, разнообразны. Например, в потенциометрии разрабатывают мембраны для изготовления ион-селективных сенсоров, во многих других методах селективность повышают экстракцией или сорбцией веществ или сочетанием методов. Важнейшими задачами при этом остаются повышение селективности, чувствительности определения веществ при одновременном улучшении характеристик точности, экспрессности, автоматизации анализа. Первостепенно такие задачи необходимо решать при разработке методик определения и контроля загрязнителей, масштабно влияющих на качество жизни человека. Одними из таких загрязнителей являются бактерии и вирусы, экспрессное обнаружение которых актуально во все времена и в любой стране, независимо от уровня развития государства.

Целью диссертационной работы Малышевой Н.Н. является разработка бесферментного электрохимического иммуносенсора и метода для количественного определения бактерий (на примере *Escherichia coli* ATCC 25922) с использованием частиц Fe_3O_4 с электроактивным покрытием в качестве сигналообразующей метки, и антигенов вирусов (на примере антигена вируса кори NovO/96) с использованием конъюгатов антител и магнитных нанокompозитных частиц.

Особенность выбранной тематики, постановка цели и задач диссертационного исследования состоит в тесной взаимосвязи с развитием современных технологий создания нанокompозитных частиц и их применением в аналитической химии, в том числе в иммуноанализе. При разработке новых методов/методик аналитической химии важно всесторонне исследовать все факторы, определяющие формирование аналитического сигнала, точность и скорость его измерения, чувствительность и селективность с учетом природы измеряемого параметра. В диссертационной работе предложен электрохимический способ регистрации откликов на содержание исследуемых бактерий и антигенов, который позволил, с одной стороны, исключить применение ферментов в анализе, с другой – с высокой чувствительностью контролировать содержание бактерий и вирусов с использованием электроактивных нанокompозитных частиц.

С этой точки зрения, поставленные в диссертационной работе цель, задачи, методы исследования и полученные результаты являются важными и актуальными для развития теории и практики иммуноанализа. В связи с этим тема диссертационной работы Малышевой Н.Н. является **актуальной** и важна для решения задач высокочувствительного, селективного и экспрессного определения бактерий, вирусов, их контроля в объектах окружающей среды. **Впервые предложены** иммуносенсоры на основе синтезированных магнитных нанокompозитных частиц с Fe_3O_4 , используемых в качестве «прямой» сигналообразующей метки; найдены рабочие условия формирования аналитического сигнала, оценены электроаналитические характеристики и селективность разработанных аналитических методик определения бактерий *Escherichia coli* и антигена вируса кори, **теоретически и экспериментально обосновано** использование нанокompозитных частиц Fe_3O_4 с электроактивным покрытием в качестве сигналообразующей метки для определения бактерий; впервые показано, что разработанный гибридный вариант иммуноанализа с использованием конъюгатов антител с магнитными нанокompозитными частицами Fe_3O_4 позволяют селективно определения антиген вируса кори, что, несомненно, определяет высокую степень **научной новизны диссертационной работы Малышевой Н.Н.**

Диссертантом исследованы размер, форма, степень агрегированности синтезированных по оригинальным методикам нанокompозитные частицы на основе Fe_3O_4 с электроактивным покрытием, определены скорость и мера проникновения их в клетки исследуемых бактерий, установлены факторы, влияющие на селективность, кинетику образования иммунокомплексов. **Практическая значимость диссертационной работы** Малышевой Н.Н. в области аналитической химии состоит в разработке оригинальных методик получения стабильных во времени

электрохимически активных нанокompозитных частиц на основе Fe_3O_4 и целого ряда модификаторов, позволившие создать диссертанту новые иммуносенсоры и способы определения бактерий *Escherichia coli* и антигена вируса кори (на примере NovO/96).

Структура диссертационной работы логично сформирована, изложение демонстрирует высокий уровень подготовки и планирования эксперимента, владение автором современными инструментальными методами исследования и методами обработки данных. В главе 1 представлен анализ литературных данных о современном состоянии методов определения бактериальных патогенов в модельных и реальных объектах, отмечены новые методы и подходы в детекции бактерий, определении вирусных агентов; изложены способы и применение нанокompозитов в детекции бактерий.

Во второй главе представлена постановка задачи исследования, описаны объекты, методы исследования и аппаратура, используемые реактивы и материалы. Изложены оригинальные методики синтеза нанокompозитов на основе Fe_3O_4 с различным электроактивным покрытием, методики микроскопического исследования, условия культивирования бактериальных штаммов, методики постановки ИФА.

Третья глава посвящена результатам синтеза предложенных нанокompозитов и исследования их различными физико-химическими и физическими методами аналитической химии. Выбранные методы анализа структуры и поверхности наночастиц, их электрохимического поведения позволили диссертанту получить все необходимые для разработки методики иммуноанализа сведения: о строении, формах, устойчивости синтезируемых частиц, кинетики образования иммунокомплексов, метрологических характеристиках способа получения электрохимического отклика.

Четвертая и пятая главы посвящены разработке новых способов иммуноанализа бактерий и антигена вируса, соответственно. Планирование эксперимента и его результаты, представленные диссертантом в главах 4 и 5, характеризуют диссертационную работу как соответствующую специальности 02.00.02-аналитическая химия.

Мальшевой Н.Н. последовательно выполнены все необходимые этапы разработки и апробации предложенных методик иммуноанализа, определения и оценки их аналитических характеристик правильности, прецизионности и селективности с учетом современных требований химической метрологии.

В главе 5 представлены и обоснованы возможности использования синтезированных нанокompозитов в качестве электрохимической «метки» для определения бактерий с использованием предложенной диссертантом процедуры иммуноанализа, определены рабочие условия получения стабильного во времени

аналитического сигнала, с использованием независимых методов исследования обоснованы оптимальные времена инкубации и образования иммунокомплекса, обеспечивающие достаточно широкий диапазон линейности аналитической функции и низкий предел обнаружения (0,12 КОЕ/мл). Показано, что предложенный способ иммуноанализа обеспечивает хорошо воспроизводимые результаты измерения с S_r не более 0,15 в концентрационном диапазоне $2,3 \cdot 10^2 - 2,3 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, а параметры селективности позволяют охарактеризовать предложенный метод определения бактерий *S.coli* как специфичный.

В главе 6 разработана схема иммуноанализа для определения антигенов вирусов с использованием нанокompозитов с оксидкремниевым покрытием, модифицированным антителами ($Fe_3O_4 - ATSiO_2$). Метод позволяет селективно определять антиген вируса кори в диапазоне концентраций $2,33 \cdot 10^{-4} - 2,33$ мг/мл в присутствии антигена вируса клещевого энцефалита.

Со всеми поставленными задачами Малышева Н.Н. справилась, выводы, заключения теоретически и практически обоснованы с использованием современных научных методов и методик, рекомендации по применению и дальнейшему развитию разработанных методик иммуноанализа и иммуносенсоров изложены с учетом современных тенденций развития аналитической химии и не вызывают сомнений в успешности их реализации как в виде патентов, так и в виде внедрения в аналитический контроль на различных предприятиях.

Практическая значимость исследования подтверждается апробацией разработанных методик в решении задач определения бактерий в реальных образцах воздуха, природных и искусственных водоемов, сравнением результатов определения с результатами независимых методов. Результаты подтверждены также методом «введено-найдено». Следует отметить достоинство предложенных способов анализа – экспрессность, широкий диапазон определяемых содержаний, низкий предел обнаружения, отсутствие необходимости использовать ферменты в анализе. Достоверность результатов исследований не вызывает сомнений.

Диссертационная работа изложена на 147 страницах компьютерной верстки, содержит 14 таблиц, 37 рисунков. Диссертация состоит из введения, 5-ти глав, выводов, списка условных обозначений и сокращений и списка литературы (194 источника).

Содержание диссертации полностью отражено в автореферате и соответствует специальности 02.00.02 – аналитическая химия. Автореферат дает полное представление об используемых методах исследования, планировании эксперимента, актуальности новизне, значимости результатов. **Автореферат соответствует содержанию диссертации.**

Апробация работы: основные результаты изложены в 19 публикациях, в том числе в 3 статьях в журналах, рекомендуемых ВАК, в 2 патентах, 9 тезисов докладов на Международных и Всероссийских конференциях.

По диссертации имеются следующие вопросы и замечания:

- 1) На стр. 11 диссертации указано, что выносится на защиту: «...метод электрохимического определения бактерии E.coli». Метод, как известно, определяет принципы, положенные в основу анализа, но безотносительно к конкретному аналиту или объекту анализа. В этой связи предложенный термин «метод» правильнее заменить на «способ» или «методику»;
- 2) Стр. 106 диссертации, таблица 4.2. По тексту диссертации и данным таблицы следует, что в таблице приведены аналитические сигналы, полученные с целью определения бактерий в исследуемом диапазоне концентраций E.coli и оценки аналитических характеристик методики, но сами аналитические характеристики методики определения бактерий в таблице не приведены.
- 3) Стр. 107 диссертации таблица 4.3. Не указана дисперсия результатов анализа независимыми методами для проведения сравнения с использованием статистических критериев (например, F-критерий и t-критерий). Какое значение имеет относительная погрешность концентрации стерильных физиологических растворов (первый столбец таблицы)?
- 4) Чем обусловлено, что при анализе бактерий использовали в качестве аналитического сигнала величину тока (мкА), а при анализе антигена вируса – dI/dE (мкА/В)?
- 5) Стр. 118 диссертации. Указано значение предела обнаружения антигена вируса кори – $1.87 \cdot 10^{-5}$ мг/мл. В заключении главы 5 (стр. 119) представлен диапазон определяемых концентраций ($2.33 \cdot 10^{-4}$ – 2.33 мг/мл) и при этом отмечено, что метод «...позволяет **определять** антиген вируса кори в модельном раствор в концентрации $1.87 \cdot 10^{-5}$ мг/мл». «Определять» – термин, относящийся к количественному анализу, предел обнаружения – это характеристика чувствительности качественного химического анализа. Какие предъявляются требования к точности методик определения антигенов вируса кори в различных объектах? И для анализа каких объектов можно использовать разработанный способ определения антигена вируса кори?

Указанные замечания и вопросы не умаляют достоинство диссертационной работы. Полученные в диссертационной работе результаты могут найти применение в научных и учебных центрах, работающих в области электрохимических методов анализа – в Казанском, Московском, Томском, Санкт-Петербургском, Башкирском

государственных, ГЕОХИ РАН, Уральском государственном экономическом университете и др., в лабораториях государственного аналитического контроля.

Диссертационная работа Малышевой Натальи Николаевны по актуальности решаемой проблемы, объему проведенных исследований, уровню их обсуждения научной значимости соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, и может рассматриваться как завершенная научно-квалификационная работа, в которой содержится решение задачи, имеющее существенное значение для развития методов бесферментного электрохимического иммуноанализа, а именно, разработка электрохимического иммуносенсора с использованием нанокompозитов на основе Fe_3O_4 для определения инфекционных агентов. Малышева Наталья Николаевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании кафедры аналитической химии Башкирского государственного университета (протокол №2 от 21 сентября 2015 года). Присутствовало на заседании 7 человек профессорско-преподавательского состава. Результаты открытого голосования: «за» - 7 человек, «против» - 0 чел., «воздержалось» - 0 чел.

Отзыв составлен доцентом кафедры аналитической химии ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», кандидатом химических наук (специальность 02.00.02 – аналитическая химия) Сидельниковым Артемом Викторовичем.

21 сентября 2015 года

Заведующий кафедрой аналитической химии
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
профессионального образования «Башкирский
государственный университет»,

д.х.н., профессор

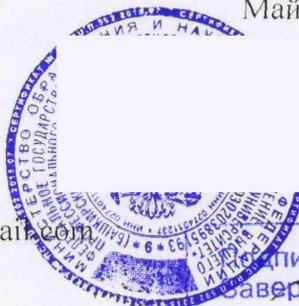
Почтовый адрес: 450076,

г. Уфа, ул. З. Валиди, 32

Тел.: 8(347) 229-97-12

Электронная почта: artsid2000@gmail.com

Майстренко Валерий Николаевич



Полностью согласен
Завещаю ученым секретарь БашГУ
Валерий С.Р.
« 21 » сентября 2015 г.