

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Малышевой Натальи Николаевны «Разработка иммуносенсора для определения *Escherichia coli* и антигена вируса кори с использованием нанокompозитов на основе Fe₃O₄» на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности

02.00.02 – аналитическая химия

Актуальность темы исследования. Патогенные микроорганизмы относятся к числу наиболее распространенных объектов анализа в пищевой промышленности, сельском хозяйстве, санитарно-эпидемиологических лабораториях, что обусловлено как большим распространением микробиологического загрязнения пищевого сырья и продуктов питания, так и тем ущербом, который наносят патогенные микроорганизмы здоровью человека. Этот ущерб складывается из увеличения частоты инфекционных заболеваний, особенно в развивающихся странах с низким уровнем иммунитета населения, но также из потерь урожая и готовых продуктов питания, уничтожаемых в силу их загрязнения патогенами. Условно патогенный штамм *Escherichia coli*, выбранный в качестве одного из объектов анализа, не только позволяет разработать новые средства обнаружения с улучшенными характеристиками, но и является удобной моделью, позволяющей оптимизировать отдельные параметры систем распознавания для последующего применения для других патогенов. То же в существенной степени можно сказать об антигене вируса кори, в равной степени моделирующей возможные решения в части определения вирусных агентов.

Существующие методы анализа, наиболее часто применяемые в рутинном лабораторном контроле, большей частью основаны на использовании визуальной оценки морфологии клеток и колоний (бактериальный посев), определении специфических иммунных реакций (иммуноферментный анализ). В последнее время к ним добавились методы прямого анализа ДНК, включая использование полимеразной цепной реакции (ПЦР). Будучи вполне надежными, они отличаются большой трудоемкостью и продолжительностью выполнения, что затрудняет их применение для оперативного контроля потенциального присутствия патогенов. Кроме того, в большинстве случаев существующие методы дают полуколичественную оценку содержания клеток, особенно при их низкой исходной концентрации в пробе. Отсюда понятен интерес к развитию альтернативных инструментальных подходов, ориентированных на быстрый и по возможности количественный отклик на присутствие патогенных микроорганизмов и вирусов. В представленной диссертации Н.Н.Малышевой рассмотрен один из наиболее перспективных вариантов такого сенсорного подхода, в котором

принципы биохимического распознавания сочетаются с использованием наночастиц феррита для повышения чувствительности сигнала. Учитывая вышесказанное, данная тема исследования является, безусловно, *научно и практически значимой*.

Структура диссертации. Работа Н.Н.Мальшевой представлена на 147 страницах машинной верстки, содержит 37 рисунков и 14 таблиц, в списке цитируемых библиографических источников – 193 описания работ отечественных и зарубежных авторов. Работа имеет традиционное строение.

Во *Введении* приведено обоснование выбранной темы исследования, положения, составляющие научную новизну и практическую значимость полученных результатов, положения, выносимые на защиту и сведения об апробации полученных результатов. Также приведена декларация личного вклада автора и данные по публикациям по теме диссертации.

В *Литературном обзоре* (глава 1) приведены сведения о существующих способах определения бактериальных и вирусных патогенов и сведения о биосенсорах, разработанных в данной области. Литературный обзор дает адекватное представление о существующих возможностях различных методов анализа и в целом убедительно подтверждает правильность выбора темы исследования. К незначительным замечаниям можно отнести некоторую непоследовательность автора, который допускает текстуальные повторы при описании принципов биосенсорного определения бактерий и вирусов и при общей характеристике биосенсоров, а также ряд технических ошибок перевода (стр.35 – рублидий бипиридил вместо рутений бипиридил). Также вызывает сомнение утверждение «Амперометрически бактерии могут быть определены по их ферментативному электроокислению/электровосстановлению...» (стр.30) в то время как ранее автор вполне справедливо упоминал о том, что амперометрически определяются метаболиты, а не бактерии в целом. Стеклоуглерод и пиролитический графит ошибочно отнесены к углеродсодержащим смесям (стр.30).

Наиболее удачна часть, посвященная собственно определению бактерий и вирусов, которая содержит исчерпывающую характеристику описанных в литературе биосенсоров, сведенных в удобные для понимания таблицы. Автор заостряет внимание на получении и использовании в анализе бактерий и вирусов наночастиц, простых и модифицированных. Использование для последних термина «нанокompозит», как и разделение материала на собственно наночастицы и нанокompозиты, дискуссионно и остается на усмотрение автора, впрочем, не мешая восприятию материала в целом.

Глава 2 «Аппаратура и техника эксперимента» содержит перечень используемых реактивов (включая биохимические) и оборудования, а также методики получения наноча-

стиц, простых и модифицированных, микроскопических исследований, иммуноферментного анализа и культивирования микроорганизмов. Подробность описания, как и использование комплекса независимых физико-химических методов получения и электрохимического исследования наночастиц позволяют сделать заключение об **обоснованности полученных с их помощью результатов.**

Собственные экспериментальные результаты автора и их обсуждение приведены в последующих главах 3-5.

Глава 3 «Синтез и исследование электроактивных нанокompозитных частиц на основе Fe_3O_4 » содержит описание наиболее интересных с точки зрения научной новизны и практической значимости результатов, связанных с получением и различной модификацией наночастиц феррита. Выбор способа модификации определялся, исходя из соображений мягкости условий, удобства проведения и возможностей получения электрохимического сигнала. Для этого использовали разные методы, включающие нанесение пленки из сорбированного дивинилбензола и пиррола с последующей радикальной полимеризацией и функционализацией полимера, а также проведение контролируемой поликонденсации силоксановых структур с присоединением ферроценового производного (золь-гель иммобилизация). Факт образования поверхностной органической пленки дополнительно подтверждали с помощью ИК-спектроскопии и электронной микроскопии. Также были установлены толщина полимерной пленки, размерное распределение частиц и их склонность к агрегации. Важным представляется также установление агрегативной устойчивости получаемых дисперсий путем визуального наблюдения и с помощью метода динамического светорассеяния.

Электрохимические свойства полученных модифицированных пленок исследовали в водном растворе на толстопленочном графитовом электроде с помощью циклической вольтамперометрии. Полученный сигнал отвечает аналогичному измерению, проведенному с модификатором в ацетонитриле, что позволило автору отнести наблюдаемый катодный пик к восстановлению хинолина в составе полимерной пленки на ферритовых частицах. Сходным образом показана возможность регистрации сигнала полипиррола – в виде покрытия сигнального электрода и в составе ферритовых частиц, помещенных на такой электрод. В случае ферроцена отличия в электрохимических свойствах свободного редокс-индикатора и его же, ковалентно связанного с силоксановой оболочкой наночастицы, отличались в большей степени, но по сохранению концентрационной зависимости и совпадению анодного потенциала пика была установлена возможность контроля концентрации метки по анодному пику окисления в области 0.55 В.

Глава 4. «Разработка бесферментного электрохимического метода определения патогенных микроорганизмов с использованием синтезированных нанокompозитов на основе Fe_3O_4 » описывает применение наноматериалов, полученных в ходе выполнения предыдущих экспериментов, в определении цельных клеток микроорганизмов. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии для трех типов полученных частиц были установлены временные интервалы, требующиеся для адсорбции наночастиц и их последующего проникновения в клетку. Наилучшие результаты были получены с ферроцен-содержащими частицами и материалами с оболочкой полипиррола, обладающего наибольшей биосовместимостью из всех изученных полимерных пленок.

Определение *E.coli* проводили, инкубируя суспензию бактерий с магнитными наночастицами с последующей инкубацией полученной смеси на толстопленочном графитовом электроде с физически адсорбированными антителами к бактериям. В последней стадии образование комплекса антиген-антитело дополнительно стимулировали магнитным полем. Количество бактерий регистрировали по величине сигнала, ранее охарактеризованного для тех же наночастиц в отсутствие микроорганизмов. Наилучшие результаты в части чувствительности отклика были получены для ферроцена (предел обнаружения 12 КОЕ/мл), сигнал хинолина пропадал в течение 10 мин. нахождения в воде, тогда как сигнал полипиррола, будучи больше по абсолютной величине, был хуже выражен и менялся слабее, чем аналогичный сигнал ферроцена. Валидацию разработанных иммуносенсоров проводили с использованием реальных объектов контроля и независимых методов (бактериальный посев и иммуноферментный анализ).

Глава 5 «Применение конъюгатов антител с нанокompозитными частицами с оксидкремниевым покрытием для определения антигенов вирусов» демонстрирует возможности разработанных наноматериалов для определения вирусов (на примере антигена вируса кори). В этом случае сначала был получен конъюгат частицы феррита с силикатным покрытием и специфических антител. Само определение проводили на поверхности толстопленочного графитового электрода, модифицированного антителами, в режиме сэндвичевого анализа. После образования тройного иммунокомплекса электрод переносили в кислотный раствор и далее регистрировали катодный ток образующихся при растворении феррита ионов Fe^{3+} , пропорциональный концентрации антигена в пробе.

Характеризуя диссертацию Н.Н.Малышевой в целом, необходимо отметить, что это целостная хорошо продуманная в методическом плане работа, которая существенно развивает наши представления об электрохимическом иммуноанализе и возможностях, связанных с использованием в составе соответствующих сенсоров магнитных наночастиц. Все

полученные зависимости оптимизированы по времени, размеру наночастиц и природе полимерного модификатора, сигналы меток соотнесены с аналогичными зависимостями, полученными в более простых, а значит, легче интерпретируемых условиях. Интересно прямое сопоставление результатов оценки распределения наночастиц по поверхности бактерий и соответствующих электрохимических сигналов, позволивших связать изменения сигнала с проникновением частиц в клетки. К числу наиболее важных положений, составивших *научную новизну исследования*, следует отнести оригинальные способы модификации частиц феррита, связанные с последующим их использованием в составе иммуносенсоров. Автору не только впервые удалось получить ряд модифицированных наноматериалов, отличающихся по биосовместимости, электрохимической активности, но и провести сравнительную оценку их поведения в составе электрохимических устройств. Полученные закономерности, связывающие способ модификации, природу редокс-активной метки и сигнал иммуносенсора, имеют значение, выходящее за рамки конкретного модельного объекта анализа. Они могут быть достаточно легко распространены на другие патогенные микроорганизмы и вирусы и могут, таким образом, существенно ускорить разработку новых иммуносенсоров с улучшенными характеристиками чувствительности и избирательности реагирования.

Практическая значимость проведенного исследования связана с конкретными методиками проведения полимеризации модифицирующих слоев и включения в них различных электрохимически активных групп. Интересны конкретные примеры иммуноанализа реальных объектов контроля, а также сопоставления результатов, полученных с помощью разработанных биосенсоров и с помощью традиционных средств микробиологического анализа.

Основные результаты проведенного исследования получены лично автором и адекватно отражены в публикациях, включающих три статьи в журналах, рекомендуемых ВАК, и два патента, а также в 14 тезисах доклада. Работа прошла хорошую апробацию на конференциях различного уровня и хорошо известная научной общественности. Автореферат полностью отражает содержание работы.

К диссертации имеется ряд замечаний непринципиального характера.

1. Автор не упоминает об оптимизации модификации толстопленочных графитовых электродов антителями, которые наносили путем простого высушивания антисыворотки. Между тем, прочность их связывания и образование равномерного слоя являются важными предпосылками достижения высокой чувствительности анализа.

2. Автор, проводя оценку электрохимических характеристик меток, не делал попыток оценить их содержание в каждой наночастице. Используемые методики полимеризации

и модификации не дают оснований считать, что во всех случаях достигается монослойное заполнение с постоянным количеством редокс-метки на одну частицу. Также в случае использования глутарового альдегида стехиометрия реакции может нарушаться в силу его олигомеризации в водном растворе, протекающей при хранении реактива.

3. В качестве предложения на будущее. Понятно, что автор ограничен в выборе pH раствора условиями взаимодействия иммунокомпонентов. Тем не менее, представляет интерес с точки зрения дальнейшего развития предложенного подхода посмотреть влияние pH на электрохимические характеристики использованных меток. Было бы также желательно подробнее рассмотреть схемы электродных реакций, протекающих при окислении/восстановлении метки.

Указанные замечания не снижают общей положительной оценки проведенной работы. Считаю, что представленная диссертация Мальшевой Натальи Николаевны «Разработка иммуносенсора для определения *Escherichia coli* и антигена вируса кори с использованием нанокompозитов на основе Fe_3O_4 » соответствует специальности 02.00.02 – аналитическая химия и удовлетворяет требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением № 842 Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года, как научно-квалификационная работа, в которой содержится решение задачи, имеющей значение для развития электрохимического иммуноанализа. Автор достоин присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Официальный оппонент,

Заведующий кафедрой аналитической химии

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,

д.х.н. (02.00.02 – аналитическая химия), профессор

Евтюгин Геннадий Артурович

г.Казань, 420008, ул.Кремлевская, 18

тел. 8-843-2337491,

e-mail: Gennady.Evtugyn@kpfu.ru

21.09.2015



ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
1391 УПРАВЛЕНИЕ ДОКУМЕНТООБОРОТА И КОНТРОЛЯ

ПОДПИСЬ
Евтюгина Г. А. заверяю
Документовед
Семенилова Ч. Н.