

ОТЗЫВ

официального оппонента Стожко Наталии Юрьевны на диссертационную работу Малышевой Натальи Николаевны на тему «Разработка иммуносенсора для определения *Escherichia coli* и антигена вируса кори с использованием нанокompозитов на основе Fe_3O_4 », представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия

Разработка методов количественного определения бактерий и вирусов различных видов является важной задачей современной медицины. Для определения инфекционных агентов в лабораторной практике используются современные высокочувствительные и селективные методы анализа ИФА и ПЦР, а также метод бактериального посева. Однако они не лишены недостатков (высокая стоимость ПЦР-оборудования, неустойчивость реагентов ИФА, длительность посева), вследствие чего ведутся непрерывные исследования по модификации существующих и разработке новых методов и подходов. Одной из тенденций современной науки является постоянное взаимодействие и интеграция различных ее областей. Физико-химические методы и подходы классической аналитической химии находят все большее применение в разработке методов и способов определения аналитов биологического характера для лабораторной медицинской диагностики. Одной из наиболее перспективных групп методов для данных целей являются высокоточные экспрессные электрохимические методы, позволяющие определять ультра-малые концентрации веществ различной природы.

Диссертационная работа Малышевой Н.Н. посвящена определению *Escherichia coli* и антигена вируса кори методом электрохимического иммуноанализа с использованием иммуносенсора на основе синтезированных магнитных нанокompозитов. Разработанный метод и сенсор позволяют селективно и с высокой точностью определять содержание конкретного штамма бактерии *E.coli* в различных модельных и реальных объектах. Несомненными преимуществами разработанного метода является отсутствие необходимости использования дорогого оборудования и нестабильных реагентов (в отличие от методов ПЦР и ИФА), а также его экспрессность (~1 часа). Данный метод, безусловно, может найти применение в медицинской практике для селективного

количественного определения различных бактерий. Все вышеприведенные факты, несомненно, свидетельствуют об **актуальности** работы диссертанта.

Диссертационная работа Малышевой Н.Н. состоит из введения, пяти глав, заключения и списка литературы, включающего 194 источника. Литературный обзор, предшествующий изложению собственных экспериментальных данных, посвящен обзору методов определения бактериальных патогенов, особое внимание уделено биосенсорам и, в частности, иммуноанализу и иммуносенсорам с применением наночастиц. Проведен детальный анализ способов синтеза и свойств различных классов наночастиц и нанокомпозитов, используемых в иммуноаналитических методах определения бактериальных и вирусных аналитов. Особое внимание автор обращает на относительно небольшое количество исследовательских работ, в которых процедуре непосредственного определения аналита в пробах со сложной матрицей (биологические образцы, пищевые продукты) предшествует минимальная пробоподготовка (разложение, концентрирование пробы, устранение мешающих компонентов), либо она совсем не требуется.

Критический анализ литературных данных позволил автору диссертационного исследования выбрать собственную стратегию по разработке оригинального иммуносенсора и метода, в котором в качестве электрохимически активной метки используются нанокомпозитные частицы. При постановке задачи Малышева Н.Н. обоснованно предполагает, что, с одной стороны, синтез и использование электроактивных нанометок в иммуноанализе позволит исключить необходимость применения дорогих и нестойких ферментов, уменьшить время анализа, а сочетание электроактивности покрытия наночастиц Fe_3O_4 с их магнитными свойствами может обеспечить сенсору высокую чувствительность. С другой стороны, такие преимущества метода электрохимического иммуноанализа как простота реализации и относительно невысокая стоимость аппаратного обеспечения (по сравнению с другими методами), а также селективность и специфичность, достигаемые за счет иммунореакции, позволят разработать экспрессный и доступный для использования в небольших лабораториях метод определения бактерий и вирусов.

Глава 2 посвящена описанию разработанных методик синтеза трех видов электроактивных нанокompозитных частиц со структурой «ядро-оболочка». В качестве материала ядра наночастиц использован магнетит, а в качестве оболочек: электроактивное полипиррольное покрытие, инертное винилбензилхлоридное покрытие, модифицированное азотсодержащими гетероциклами, и оксидкремниевое покрытие, модифицированное производным ферроцена. В этой главе приведены методики микроскопических исследований, условия культивирования использованных в исследовании бактериальных штаммов.

В **Главе 3** приведены ИК-спектроскопические характеристики синтезированных нанокompозитов, микрофотографии и результаты определения размерных характеристик нанокompозитных частиц методом просвечивающей электронной микроскопии. Показана динамика изменения размеров агломератов нанокompозитных частиц в водных суспензиях. На основании полученных данных автором выбраны оптимальные количественные соотношения реагентов при синтезе, позволяющие получить нанокompозитные частицы с равномерным покрытием, а также установлены устойчивые во времени концентрации их водных суспензий.

Основной частью третьей главы является исследование электрохимических свойств синтезированных нанокompозитов. Для всех трех типов нанокompозитных частиц электрохимические сигналы на вольтамперограммах сопоставлены с сигналами индивидуального соединения, выступающего в качестве электроактивного модификатора для данного нанокompозита, получены линейные зависимости аналитического сигнала от концентрации нанокompозитных частиц в исходной модифицирующей суспензии.

Глава 4 посвящена непосредственно разработке метода определения бактерии *E.coli* с использованием синтезированных нанокompозитов в качестве сигналообразующей метки. Установлены оптимальные условия проведения анализа (время инкубации нанокompозитных частиц с клетками и время образования иммунного комплекса). Проведен выбор нанокompозита, позволяющий получить в результате реализации процедуры иммуноанализа стабильный аналитический электрохимический сигнал. Приведены аналитические характеристики разработанного метода, исследованы правильность, специфичность

и селективность. Показана хорошая сходимость результатов количественного определения *E.coli* в модельных и реальных объектах (пробах воды и воздуха) с данными, полученными традиционно используемыми методами ИФА и бактериального посева в независимой лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск).

Глава 5 посвящена второму направлению диссертационного исследования – разработке подхода к использованию нанокompозитных частиц для определения антигенов вирусов (на примере антигена вируса кори). В главе приведена методика получения конъюгатов антител с нанокompозитными частицами на основе Fe_3O_4 с оксидкремниевым покрытием, методика проведения анализа и результаты определения содержания антигена в модельном растворе.

Представленные в работе выводы научно обоснованы и подтверждаются полученными диссертантом экспериментальными данными. Результаты исследования Н.Н. Малышевой апробированы на конференциях различного уровня и представлены в виде 3 статей в журналах, рекомендованных ВАК. Отдельно стоит отметить, что разработанные автором способ определения содержания грамтрицательных патогенных бактерий в анализируемой среде и способ электрохимического иммуноанализа для определения вирусов/антигенов вирусов защищены патентами РФ.

Достоверность результатов подтверждается использованием современных методов исследования и оборудования, а также реактивов высокой степени чистоты. Полученные данные характеризуется хорошей воспроизводимостью и согласуются с результатами анализа проб, выполненными в независимой лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» референсными методами ИФА и бактериального посева.

Результаты диссертационной работы **вносят существенный вклад** в разработку и внедрение методов электрохимического иммуноанализа в медицинскую диагностику, поскольку несомненными преимуществами разработанного автором метода является простота его выполнения, низкая себестоимость анализа, отсутствие сложной пробоподготовки и необходимости работы с токсичными веществами, а также хорошая воспроизводимость результатов анализа.

Научная новизна диссертационной работы Малышевой Н.Н. состоит в том, что автором впервые получена информация об электрохимическом поведении полученных по оригинальным методикам нанокомпозитов (Fe_3O_4 –полипиррол, Fe_3O_4 –модифицированный хинолом поливинилбензилхлорид, Fe_3O_4 –модифицированный ферроценом оксид кремния). Показана возможность применения синтезированных нанокомпозитов в качестве «прямой» сигналообразующей метки в методах электрохимического иммуноанализа для определения бактерий и антигенов вирусов и установлены оптимальные условия проведения анализа. Доказана применимость разработанных методов к определению содержания бактерий *E.coli* в реальных объектах (пробах воды и воздуха).

Автором получен массив экспериментальных результатов, проведено его обобщение, обработка и анализ. Безусловным достоинством диссертационной работы является ее **практическая значимость**. Результаты работы, а именно, разработанные методы экспрессного бесферментного определения бактерий и антигенов вирусов, могут быть востребованы в санитарных и аналитических лабораториях, лабораториях Роспотребнадзора различного уровня.

По работе имеются следующие вопросы и замечания:

1. Наблюдается сдвиг потенциала электрохимического сигнала нанокомпозита на основе Fe_3O_4 , зарегистрированного до и после проведения процедуры иммуноанализа. Чем обусловлен этот сдвиг?
2. Сравнение результатов определения концентрации микроорганизмов *E.coli* в модельных смесях и реальных объектах разработанным и независимыми методами целесообразно было провести с помощью критериев Стьюдента и Фишера.
3. Проводились ли исследования по использованию разработанного метода и иммуносенсора для определения других типов бактерий помимо *E.coli* штамм АТС 25922?
4. В экспериментальной части не описана процедура отбора проб воздуха.
5. В подписи к рисунку 5.2 в диссертации не указана концентрация добавки стандартного раствора Fe(III) .

Возникшие вопросы и замечания не снижают общей положительной оценки диссертационной работы.

Текст автореферата полностью соответствует содержанию диссертации.

Диссертационная работа представляет собой завершённое исследование, которое соответствует требованиям п.9 Положения о порядке присуждения ученых степеней (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 №842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор – Малышева Наталья Николаевна – заслуживает присуждения степени кандидата наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Заведующая кафедрой физики и химии
Института торговли, пищевых
технологий и сервиса ФГБОУ ВПО
«Уральский государственный
экономический университет», доктор
химических наук по специальности
02.00.02 - Аналитическая химия,
профессор



 Наталья Юрьевна
Стожко

25.09.2015 г.

620144, Екатеринбург, ул. 8-е Марта/Народной воли, 62/45.
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Уральский государственный экономический университет».
Телефон: 8(343) 251-96-13.
Адрес электронной почты: spu@usue.ru.

