ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Сваловой Татьяны Сергеевны

«Разработка электрохимических иммуносенсоров для определения бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* с использованием наночастиц Fe_3O_4 в качестве прямой сигналообразующей метки», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

Актуальность исследования. Диссертация Сваловой Т.С. посвящена совершенствованию методов диагностики заболеваний бактериальной этиологии на примере обнаружения *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* на основе биосенсорных подходов. Необходимость подобных исследований диктуется большим распространением указанных заболеваний в свете общего снижения иммунитета населения и ослабления гигиенических требований в обществе, а также необходимостью дальнейшего развития принципов электрохимического иммуноанализа с целью создания портативных диагностических устройств для использования вне лабораторной базы. Альтернативные методы диагностики, основанные на бактериальном посеве, классическом иммуноферментном и ДНК-анализе, имеют ряд недостатков. Среди них длительность, недостаточная точность и воспроизводимость результатов, высокие требования к квалификации персонала, необходимость в специальных реагентов и ряд других. Учитывая, что большинство предлагаемых решений достаточно перспективны и для других потенциальных бактериальных агентов, вышесказанное определяет ***актуальность*** цели исследования, связанной с созданием бесферментного электрохимических иммуносенсоров для количественного определения указанных бактерий с использованием в качестве метки наночастиц магнетита. Для достижения поставленной цели автором сформулирован ряд задач, включающих синтез и всестороннюю характеристику наночастиц магнетита до и после их модификации и включения в состав иммуносенсоров, а также подбор рабочих условий осуществления собственно иммунохимического определения бактерий и совершенствование алгоритмов связанных с ним процедур пробоподготовки, получения и обработки аналитического сигнала.

Диссертация Сваловой Т.С. изложена на 150 страницах текста компьютерной верстки. Работа состоит из введения, четырех глав, заключения и выводов, списка литературы и приложения. Диссертация содержит 32 рисунка и 10 таблиц, в списке

литературы 246 библиографических описаний работ отечественных и зарубежных авторов.

Во ***Введении*** обоснована актуальность выбранной темы диссертации, задачи и цели исследования, приведены положения, составляющие научную новизну и практическую значимость исследования, а также положения, выносимые на защиту. Освещены методология исследования, структура диссертации и сведения о ее апробации на конференциях различного уровня и публикациях по результатам проведенных исследований.

Глава 1 «Обзор литературы» содержит общие сведения о биосенсорах, начиная с их классификации и краткой истории развития и заканчивая примерами использования наноматериалов в составе различных биосенсоров. Возможно, выбранная тематика обзора покажется излишне широкой для кандидатской диссертации, когда лучше сконцентрироваться на особенностях конструкции биосенсоров, близких к предлагаемым в самой диссертации. Однако излишняя широта охвата биосенсорной тематики искупается правильным выбором цитируемых источников: при иллюстрации тех или иных подходов к созданию биосенсоров Свалова Т.С. обращается к биосенсорам, посвященным определению тех же бактериальных агентов или использующих те же способы модификации электродов, что и автор. Описание удачно дополняют сводные таблицы с примерами биосенсоров для решения конкретных аналитических задач, а также диаграммы, приведенные с той же целью. К числу несущественных недостатков следует отнести относительно большое число оговорок и неточностей, связанных с непринципиальными моментами. Так, автор ошибочно указал на 1956 год как дату первой публикации по биосенсорам (должно быть – 1962), аптамеры спутал с пептидонуклеиновыми кислотами (аптамеры содержат рибозофосфатные фрагменты), электрод Кларка посчитал примером потенциометрического сенсора, а измерение pH - связанным с переносом электронов. Указанные замечания не снизили общей положительной оценки данной части работы, которая составляет верное впечатление о достижениях и проблемах, стоящих перед биоанализом бактериальных агентов, достоинствами и недостатками применения наночастиц в составе биосенсоров. Заключительная часть литературного обзора частично повторяет введение в обосновании цели и задач диссертационного исследования.

Глава 2 «Аппаратура и техника эксперимента» содержит информацию об используемых реагентах и оборудовании, методиках синтеза, модификации и ис-

следования наночастиц. Подробность изложения, как и использование для оценки правильности измерений стандартных методов иммуноанализа, проведенных на базе ГНЦ «Вектор», позволяют сделать заключение о ***достоверности*** полученных экспериментальных данных и выводов на их основе.

Собственные результаты, полученные Сваловой Т.С., приведены в последующих главах 3 и 4.

Глава 3 «Исследование характера электропревращений наночастиц магнетита в апротонных средах» посвящена выбору условий синтеза и модификации магнитных наночастиц, а также электрохимическим процессам, протекающим на электродах, модифицированных такими частицами в апротонной среде. Определены размерный состав и степень агрегированной частиц феррита, влияние на указанные параметры двух модификаторов, различающихся по природе и заряду – хитозана и 3-аминопропилтриэтоксисилана. Изучена возможность анодного растворения частиц феррита и определения концентрации образующихся ионов железа. Определены число электронов и природа образующихся частиц в зависимости от поляризации электрода. Из числа наиболее интересных результатов следует отметить влияние ионов лития фонового электролита на эффективность электрохимического определения частиц феррита. Основным результатом исследований явилось установление количественной связи между концентраций суспензии феррита и измеряемым электрохимическим параметром. В качестве последнего выбрано количество электричества, отвечающее полному анодному превращению аналита им получаемое путем интегрирования соответствующего пика на вольтамперограмме.

Глава 4 « Электрохимические иммуносенсоры на основе наночастиц магнетита» логически продолжает исследования в Главе 3 и посвящена использованию феррита как метки в иммуноанализе бактерий. Существенная часть исследования посвящена электроно-микроскопическим исследованиям, в ходе которых была установлена динамика взаимодействия наночастиц феррита с клетками и определена продолжительность контакта, отвечающая наиболее интенсивным взаимодействиям, сопровождающимся изменениями структуры биологической мембраны (ее уплотнение и внедрение наночастиц) и включением наночастиц в цитозоль клетки (эндоцитоз). После установления требований к продолжительности контакта были установлены рабочие условия прямого иммунохимического определения бактерий с помощью иммуносенсора на основе планарных электродов. В работе сравнивали три электрода – платиновый немодифицированный и покрытый

пленкой золота или углеродными нанотрубками. Из них наибольшая эффективность связывания антител была найдена для немодифицированного электрода, наихудшая – для электрода, покрытого слоем углеродных нанотрубок. Были определены и другие рабочие условия измерения, включая концентрацию суспензии феррита, pH среды и время экспозиции.

По результатам проведенных экспериментов предложены методики определения бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266 в модельных суспензиях и реальных пробах. Высокая избирательность определения подтверждена модельными экспериментами с *Salmonella infantis*, испытаниями двух- и трехкомпонентных смесей, а также анализом реальных объектов контроля. Предел обнаружения составил для *Escherichia coli* ATCC 25992 9.3 КОЕ/мл, для *Staphylococcus aureus* B-1266 – 8.7 КОЕ/мл.

Выводы и заключение обобщают основные результаты, полученные в работе, с указанием наиболее значимых возможных направлений дальнейшего развития указанной тематики исследования.

Характеризуя диссертацию Сваловой Т.С. в целом, следует отметить, что это значительное многоплановое исследование, в котором на примере двух распространенных объектов микробиологического анализа рассмотрены и систематизированы факторы, определяющие величину и чувствительность прямого электрохимического сигнала, базирующегося на использовании в качестве метки наночастиц феррита. Проведенное автором исследование охватывает все стадии эксперимента, начиная выбора рабочих условий синтеза и стабилизации наночастиц до контроля правильности измерений с привлечением независимых стандартных методов иммуноферментного анализа. Помимо задачи получения надежного аналитического сигнала установлены критерии получения устойчивых к автоагрегации магнитных наночастиц и условия их достижения. Проведено подробное изучение механизма электрохимического превращения феррита на поверхности электрода в неводных средах. Определены продукты электрохимической реакции и важность стадий предэлектролиза для получения приемлемых характеристик точности и воспроизводимости результата определения.

Свалова Т.С. не ограничилась исследованиями собственно электрохимии феррита, существенная часть работы посвящена электроно-микрографическому исследованию наночастиц и стадий их взаимодействия с клетками. Определены важность включения в состав частиц модификаторов различной природы. При иденти-

фикации продукта электрохимической реакции использовалась спектрофотометрия.

Работа обладает несомненной ***научной новизной***. Она связана с электрохимической характеристикой наночастиц феррита и их применением для безферментного электрохимического иммуноанализа бактериальных агентов.

Практическая значимость проведенного исследования определяется разработкой простых и удобных в использовании методик синтеза и контроля качества наночастиц феррита, а также простых и экспрессных методиках определения бактериальных агентов на их основе.

Несмотря на общее положительное заключение о работе, к ней имеются замечания. Часть из них изложена по тексту при характеристике отдельных глав диссертации. Также необходимо отметить следующее:

1. В диссертации обходится вопрос о механизме действия модификаторов наночастиц. Если в случае с хитозаном, ранее достаточно подробно исследованном в литературе, вопросов не возникает, то для 3-аминопропилтриэтоксисилана возможны два пути – сорбционный и поликонденсация с образованием силоксановых полимерных пленок на поверхности. Представляло интерес дополнительно изучить, какой механизм реализуется в данном конкретном случае.

2. Автор констатирует важность стадии иммобилизации антител, но ограничивается установлением влияния природы модификатора электрода - носителя антител. Многие вопросы, включая время жизни модифицированного антителами электрода и изменение характеристик иммуноопределения в процессе его хранения, остались за рамками работы.

3. Все процедуры измерения включают достаточно продолжительные стадии экспозиции. Это вполне приемлемо с точки зрения самого анализа, однако ставят вопросы о возможном влиянии на результаты измерения деления клеток. Также интересен вопрос, влияет ли на процесс внедрения частиц феррита витальность клеток – то есть одинаковым ли образом метятся живые жизнеспособные клетки и мертвые. Это может сказаться на правильности измерения реальных объектов контроля.

4. В работе встречаются отклонения от общепринятого употребления ряда терминов. Например, табл. 10 и 11 называются «Оценка воспроизводимости…», тогда как речь идет о правильности измерения, в табл.12 и 14 лучше приводить

критерий Фишера. Кроме того, имеет смысл проверка гипотезы о нормальности распределения экспериментальных значений.

Указанные замечания носят непринципиальный характер. Материалы диссертации прошли апробацию на многочисленных конференциях, полученные результаты опубликованы в двух журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов кандидатских диссертаций, имеется один патент и 10 тезисов доклада. Ссылки на собственные работы автора в диссертации присутствуют. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

На основании вышесказанного считаю, что диссертация Сваловой Т.С. «Разработка электрохимических иммуносенсоров для определения бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* с использованием наночастиц Fe_3O_4 в качестве прямой сигналообразующей метки» соответствует требованиям пункта 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановление Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациями, как научно-квалификационная работа, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области электрохимического иммуноанализа. Автор работы, Свалова Татьяна Сергеевна, достойна 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»,
доктор химических наук, профессор

Евтюгин Геннадий Артурович

г.Казань, 420008, ул.Кремлевская, 18
тел. 8-843-2337491, e-mail: Gennady.Evtugyn@kpfu.ru

12 мая 2016 г.

ПОДПИСЬ
Евтюгина Г.А. заверяю
Документовед