

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Козициной Алисы Николаевны «Электрохимические сенсорные системы на основе органических и неорганических наноразмерных модификаторов для бесферментного определения клинически значимых соединений», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

Актуальность темы исследования. Представленная диссертация А.Н. Козициной посвящена развитию теоретических и прикладных основ функционирования электрохимических бесферментных сенсоров, рассматриваемых как альтернатива традиционным средствам клинической диагностики. Приоритетные направления научно-технологического развития Российской Федерации включают, среди прочих, переход к персонализированной медицине и высокотехнологичному здравоохранению. Такой переход невозможен без появления портативных аналитических устройств, которые бы позволяли проводить химический анализ соединений, необходимых для постановки диагноза, у постели больного. Потребность в таких устройствах, как и дефицит предложения на рынке аналитического приборостроения, очевидны. Примером подобного рода анализаторов выступают биосенсоры, которые по сути имитируют реакции аналитов в живом организме, используя для этого ферменты, антитела или нуклеиновые кислоты. Это анализаторы глюкозы, оксалата, мочевины, иммуносенсоры и ряд других. Их внедрение и использование в рутинной врачебной практике ограничивается недостаточной устойчивостью сигнала, относительно коротким временем жизни и в ряде случаев – достаточно сложным протоколом измерения и обработки результатов. Поэтому в последнее время помимо исследований, связанных с улучшением параметров биосенсоров, развернуты работы над их аналогами, включающими вместо биохимических рецепторов их более устойчивые «неживые» аналоги. Задачей таких исследований является сохранение достоинств, присущих биосенсорам, при радикальном улучшении операционных характеристик. В состав таких сенсоров, реализующих принципы биомиметики, включают наноразмерные материалы и полимеры с молекулярными отпечатками, которые в той или иной степени воспроизводят стадии распознавания и последующего количественного определения аналитов. Развитие указанного направления и выход на практическое применение сенсоров требуют дальнейших усилий по созданию, апробации и настройке характеристик указанных новых материалов.

В свете вышесказанного тема диссертационной работы А.Н. Козициной, посвященной развитию теоретических представлений и методологии функционирования бесферментных электрохимических сенсоров и иммуносенсоров на основе новых материалов, таких как наночастицы металлов и их оксидов и органические модификаторы, включая име-

ющие молекулярные отпечатки, с их последующим применением для определения возбудителей заболеваний, антител и контроля биохимических показателей, является *актуальной, научно и практически значимой*.

Для достижения указанной цели автором были поставлены и решены следующие задачи:

- установление взаимосвязи между характеристиками синтезированных материалов и свойствами электрохимических сенсоров и иммуносенсоров на их основе;
- разработка способов бесферментного определения болезнетворных бактерий, антигена вируса кори, холестерина, мочевины, креатинина;
- развитие концепции использования наночастиц благородных металлов, оксидов никеля, органических добавок, сочетающего электрокатализ, ионообменное концентрирование и получения молекулярных отпечатков;
- создание простых и эффективных конструктивных решений для реализации найденных закономерностей и применения синтезированных материалов.

Отдельно следует отметить проведенную оценку токсического действия наночастиц металлов и их оксидов с учетом динамики их проникновения в клетку.

Диссертация А.Н. Козициной изложена на 343 страницах компьютерной верстки и состоит из введения, 5 глав, заключения, списка литературы и приложений. В работе приведены 98 рисунков, 13 схем и 67 таблиц, а также библиографические описания 388 работ отечественных и зарубежных авторов.

Во *Введении* приведены обоснование актуальности проведенного исследования, степень разработанности проблемы, положения, составляющие научную новизну и теоретическую и практическую значимость, методология и методы исследования, а также положения, выносимые на защиту. Представлены сведения об апробации диссертации и опубликовании полученных результатов в реферируемых журналах и главах монографий.

Глава 1 «Литературный обзор» начинается с общего описания имеющихся источников информации, посвященных биосенсорам и электрохимическим сенсорам. Перечислены этапы создания биосенсоров и используемые для них методологические решения. В этой части автор не ограничивается рассмотрением электрохимических биосенсоров – проводится сравнение характеристик и областей применения биосенсоров с хемилюминесцентными и масс-чувствительными системами регистрации сигнала. Далее описаны базовые принципы функционирования ферментных биосенсоров с примерами их реализации на основе различных наноматериалов, играющих роль каталитических добавок, носителей биохимических компонентов и сигналообразующих компонентов биосенсоров. Аналогичный, но более краткий анализ дан также для микробных, тканевых и ДНК-сенсоров. Основная часть Литературного обзора посвящена наноматериалам – их получению, способам функ-

ционализации, включая получение молекулярных отпечатков, и использованию в (био)сенсорах. Обзор заканчивается рассмотрением иммуносенсоров с упором на применение наноматериалов, описанных в предыдущих разделах. В целом Литературный обзор дает адекватное представление о состоянии проблемы конструирования и применения электрохимических биосенсоров и использовании в них наноматериалов. Он написан хорошим языком и содержит много поясняющих рисунков, схем и таблиц. Как непринципиальное замечание можно указать на нелогичность рассмотрения иммуносенсоров в отрыве от ДНК-сенсоров, после наноматериалов, несмотря на их идеологическую (а иногда и конструктивную) близость.

Глава 2 «Аппаратура и техника эксперимента» содержит описание электрохимического и иного оборудования, используемых реагентов и методики приготовления и характеристики наноматериалов, электрохимических сенсоров и биосенсоров. Также приводится информация об объектах анализа и независимых биохимических методах их характеристики (иммуноферментный анализ, ПЦР, токсикологические эксперименты). Описание методик весьма подробно, особенно в части приготовления и модификации наноразмерных материалов и получения поверхностных молекулярных отпечатков аналитов. Это позволяет сделать заключение о *достоверности* результатов, полученных с помощью соответствующих сенсоров и протоколов измерения сигнала. Некоторые вопросы, касающиеся получения наночастиц и характеристики их поверхности, расписаны настолько исчерпывающе, что могли бы украсить и последующие главы, посвященные собственным результатам соискателя.

*Глава 3 «Варианты бесферментных электрохимических способов и иммуносенсоров на основе наночастиц, нанокмполитов магнетита для определения содержания патогенных микроорганизмов *Salmonella typhimurium* SL 7207, *Escherichia coli* ATCC 25992, *Staphylococcus aureus* B-1266 и антигена вируса кори»* посвящена созданию методов иммуноанализа и прямого определения патогенных микроорганизмов, альтернативных традиционному иммуноферментному анализу. Особенностью предлагаемого подхода является использование наночастиц металлов и их оксидов как сигналообразующей метки. В частности, антиген клещевого энцефалита определяли с помощью конъюгата протеина А с коллоидным серебром. Следующим этапом стало использование в том же качестве наночастиц феррита. Следует оговориться, что магнитное сепарирование достаточно подробно описано в иммуноанализе, выпускают даже иммунореагенты, модифицированные такими частицами. Однако регистрация сигнала, генерируемого при окислении таких меток, ранее не использовалась. Несмотря на кажущуюся простоту подхода, его применение потребовало решения ряда нетривиальных задач для ответа на вопрос об корректности интерпретации получаемого сигнала. В частности, было непонятно, где локализованы наночастицы феррита и связана ли область локализации с чувствительностью определения. Необходимо

отметить тщательность методической проработки вопроса: в холостых и модельных экспериментах установлены оптимальные условия инкубирования, магнитного сепарирования и последующей кислотной обработки пробы. Аналитическим сигналом служил ток восстановления образующегося иона Fe^{3+} , определяемый по производной вольтамперной кривой. Установлено сокращение времени анализа и снижение нижней границы определяемых содержаний антигена на два порядка величины при использовании магнитного сепарирования. Правильность определения подтверждена параллельным использованием независимых методов анализа (ПЦР и бактериальный посев).

Вариацией метода определения *S. typhi* стал электрохимический иммуноанализ с использованием поверхностно модифицированных наночастиц феррита. Модельным анализом выступила кишечная палочка *E. coli*. Функционализация понадобилась как для улучшения взаимодействия клеток с наночастицами, так и для генерации сигнала от электрохимически активных групп модифицирующих покрытий. Автором рассмотрены различные способы модификации и редокс-метки, которые в целом «закрывают» все многообразие применяемых на сегодняшний день способов модификации наночастиц в электрохимическом анализе. Это нанесение электрохимически активных полимеров (полипиррол) и ковалентная пришивка к носителю редокс-активных групп (ферроцен), в последнем случае – в сочетании с реакцией поликонденсации кремнийорганического носителя. Проведено сравнение различных способов регистрации сигнала образования иммунокомплекса на модельных суспензиях микроорганизмов и реальных объектах контроля. Правильность подтверждали сравнением результатов определения с бактериальным посевом и стандартным иммуноферментным анализом со спектрофотометрической регистрацией отклика. Селективность определения контролировали в холостых экспериментах в присутствии *S. infantis*, *Micrococcus flavus* и *Bacillus licheniformis*. Также новым является подход к иммуноанализу, в котором электрохимический сигнал регистрировали в неводной среде. Использование ацетонитрила снизило перенапряжение электродных реакций и расширило доступную область катодных потенциалов. Установлена стехиометрия переноса электрона и обоснованы продукты реакции предварительного катодного восстановления наночастиц феррита на поверхности платинового электрода. Химизм процесса независимо подтвержден данными спектрофотометрии фенантролиновых и роданидных комплексов железа. Сборку модифицированного слоя на печатных графитовых электродах четырех типов контролировали также с помощью спектроскопии электрохимического импеданса. Правильность результатов была подтверждена прямым сравнением состава суспензий микроорганизмов и результатов электрохимического иммуноанализа, а также параллельными измерениями числа клеток и концентрации антигена с помощью иммуноферментного анализа и бактериального посева.

Жизнеспособность разработанного способа определения сигнала иммуносенсора была подтверждена на примере определения антигена вируса кори в варианте сэндвичевого иммуноанализа с вторичными антителами, несущими наночастицы с редокс-активными группами.

Глава 4 «Варианты бесферментных электрохимических способов и сенсоров на основе катализаторов, содержащих соединения Ni(II), Co(II) органической и неорганической природы, наноксиды никеля(II), наночастицы серебра, золота, наносплавы, наночастицы типа ядро-оболочка для определения мочевины, креатинина, холестерина» продолжает демонстрацию преимуществ бесферментных вариантов электрохимического анализа на примере определения метаболитов, используемых в медицинской диагностике. Для повышения чувствительности их определения использовали электрокаталитические свойства переменновалентных металлов, их оксидов и комплексов. Все катализаторы наносили на электрод из суспензий/растворов прекурсоров и перед использованием активировали в режиме многократного циклирования потенциала. Выявлены фундаментальные закономерности, связывающие условия получения наночастиц и их преобработки и аналитические характеристики определения аналитов. Для этого проведен скрининг электрохимической активности комплексов ионов металлов – редокс-катализаторов – с новыми лигандами, ранее в подобных системах не применявшимся. Тщательный подбор состава комплексов и условий их нанесения позволил в некоторых случаях превзойти по чувствительности стандартные методы иммуноанализа, применяемые в биохимических лабораториях. Для отделения мешающих компонентов при анализе сыворотки крови предложено использовать анионообменную колонку, задерживающую способные к окислению аскорбиновую и мочевую кислоты. Сопоставление с опубликованными аналогами показывает преимущества разработанных сенсоров на мочевины по сравнению с уреазными сенсорами и сопоставимые характеристики определения креатинина. Во всех случаях прямым достоинством подходов, развитых в работе, является высокая стабильность отклика и значительное время жизни сенсоров.

В случае холестерина проведено сравнение аналитических характеристик его определения с использованием наночастиц благородных металлов и их сплавов, а также соединений никеля и кобальта и роданид-ионов. Электрохимические характеристики каталитического окисления устанавливали с применением стандартных методов исследования.

Одним из основных научных достижений представляется развитие концепции молекулярных отпечатков и использование их в сочетании с приемом магнитного сепарирования с ферритовыми наночастицами для определения креатинина и холестерина. А.Н.Козициной удалось подобрать структуру мономеров и подложки для нанесения полимеров таким образом, чтобы существенно улучшить характеристики определения указанных соединений. В частности, для определения холестерина предложена проточная ячейка, в которой

происходит последовательная модификация электрона катализатором, накопление аналита на суспензии магнитных частиц с полимером с молекулярными отпечатками с последующей десорбцией аналита и его хроноамперометрическим определением. Разработанный прототип ячейки может быть использован как основа создания и других портативных анализаторов с электрохимической регистрацией сигнала.

Глава 5. «Вольтамперометрические методы в анализе токсичности наноматериалов» достаточно нетрадиционна для исследований в области электроанализа. Она посвящена применению приемов оценки количества наночастиц, накапливаемых в клетке, как меры их жизнеспособности. Включение такой главы в диссертационное исследование представляется в высшей мере уместным, поскольку связано с обеспечением безопасности работников, занятых в сфере синтеза и использования наноразмерных материалов, в том числе, применяемых в данной работе, а также дает простой инструментарий для оценки такой токсичности по электрохимическим показателям. Внедрение наночастиц серебра, золота и феррита контролировали по данным проникающей электронной микроскопии и по сигналу, измеренному в режиме инверсионной вольтамперометрии. Оценены кинетика накопления металлов в клетках и связь их количеств с жизнеспособность клеток, оцениваемых по ряду независимых показателей. Для железосодержащих частиц, чья токсичность была ниже, чем для частиц благородных металлов, также изучено влияние размерного состава частиц на проявляемый токсический эффект. Для этого использовали результаты сдвигов клеточного состава бронхоальвеолярной жидкости крыс при интратрахеальном и внутривенном инъекционном введении материалов. Установлена более высокая токсичность наночастиц по сравнению с микрочастицами при одинаковой массе введения в организм.

Диссертация заканчивается *Заключением*, в котором обобщены основные полученные экспериментальные результаты и теоретические выводы на их основе, связанные с двумя аспектами исследования, а именно, с развитием бесферментных методов электрохимического анализа и иммуноанализа и с возможностями электрохимических методов исследования в контроле токсических свойств наноматериалов. Кроме того, в *Заключении* приводятся перспективные направления применения наноматериалов в электрохимическом анализе, как они видятся в результате обобщения полученных автором собственных и анализом литературных данных в указанной области.

Характеризуя диссертацию А.Н.Козициной в целом, необходимо отметить, что это значительное комплексное исследование, в которой на многочисленных примерах рассмотрены различные подходы к получению и применению в решении задач электрохимического анализа наноразмерных материалов, обладающих сигналообразующей, электрокаталитической и сепарирующей функцией. Автором определены наиболее перспективные способы модификации поверхности материалов и методологические основы их предварительного

скрининга и модификации в соответствии с проявляемыми электрохимическими и иными свойствами. В своей работе автор широко использует современный арсенал электрохимических методов анализа, включая спектроскопию электрохимического импеданса и вращающийся дисковый электрод. Достаточно необычно и в целом позитивно с точки зрения достигнутого результата применение апротонных растворителей в электрохимической оценке модификаторов и катализаторов электрохимического превращения аналитов. Наноматериалы охарактеризованы с привлечением зондовой микроскопии. Она же применяется для доказательства пенетрации клеток наночастицами металлов и феррита. А.Н.Козицина свободно оперирует и использует в работе инструментарий микробиологического анализа, результаты определений верифицированы с использованием независимых методов спектрофотометрии, бактериального посева и иммуноанализа.

К числу основных положений, составляющих *научную новизну* исследования, относятся:

- Развитие новых подходов и поиск оптимальных алгоритмов направленного отбора наноматериалов в зависимости от конкретной аналитической задачи.
- Установление количественных связей между природой наноматериалов, способом их получения и модификации и свойствами, проявляемыми в составе электрохимических сенсоров и иммуносенсоров.
- Направленный выбор способа модификации поверхности наночастиц при конструировании электрохимических иммуносенсоров в зависимости от особенностей определяемых микроорганизмов (грамположительные и грамотрицательные бактерии, вирусы).
- Использование апротонных сред для установления электрохимических характеристик модифицирующих компонентов наночастиц и определения сигнала сенсоров на их основе.
- Установление зависимости между природой и размерным составом частиц и их токсическим действием; применение электрохимических параметров для оценки цитотоксического действия наночастиц серебра, золота и феррита.

Новизна предложенных в диссертации подходов подтверждена получением шести патентов РФ.

Теоретическая и практическая значимость работы состоит в том, что в ней:

- Разработаны новые электрохимические сенсоры и иммуносенсоры на основе модифицированных наночастиц металлов, их оксидов и комплексов, обладающие улучшенными характеристиками определения ряда органических соединений, используемых в медицинской диагностике, а также патогенных микроорганизмов и антигена вируса кори.
- Разработана методология поверхностной модификации наночастиц и получения на них молекулярных отпечатков с целью повышения чувствительности определения аналитов и достижения возможности проведения измерения в биологических средах.

- Развита и реализована в виде конструкций проточных ячеек и новые устройства для измерения аналитического сигнала в неводных средах с использованием разработанных бесферментных электрохимических сенсоров на основе наноматериалов.
- Проведен скрининг новых органических соединений – комплексообразователей для включения в состав перспективных материалов с электрокаталитическими свойствами для использования в составе электрохимических сенсоров широкого назначения.
- Предложена и обоснована методология оценки токсических свойств наноразмерных частиц после их проникновения в клетки по электрохимическим характеристикам и связи таких характеристик с жизнеспособностью и цитокинным статусом клеток.

О значимости исследования и перспективах использования полученных результатов в медицинской диагностике говорят акты внедрения, полученные в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирск) и Екатеринбургском медицинском научном центре профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий Роспотребнадзора (Екатеринбург).

Несмотря на общее положительное заключение по работе, к ней имеется ряд замечаний принципиального характера.

1. Говоря о характеристиках наноразмерных материалов, автору следовало бы остановиться на такой проблеме, типичной для применения наночастиц, как их спонтанная агрегация и непостоянство характеристик при хранении или существенном изменении химического состава микроокружения. Возможно, следовало бы на каких-то примерах показать тренды изменения сигнала (если они есть) или обсудить условия сохранения устойчивого сигнала. В работе подобного рода информация есть только для сенсоров для определения мочевины и креатинина.

2. Хотя электрохимическая часть работы проработана весьма тщательно, хотелось бы больше внимания к вопросам возможного мешающего влияния компонентов биологических объектов, в частности, билирубина и сывороточных белков при определении мочевины и креатинина в сыворотке крови, а также растворенного кислорода при регистрации катодных токов.

3. При рассмотрении включения наночастиц в состав клеток остается открытым вопрос, влияет ли и как на этот процесс деление клеток и насколько равномерно распределение частиц в суспензии микроорганизмов. Приведенные микрофотографии дают только качественное представление об этом, хотелось бы видеть оценку частотного распределения клеток по количеству внедренных частиц и возможную связь такого распределения с параметрами сигнала.

4. Говоря об окислении холестерина, автор использует аналогию с ферментативной кинетикой. На наш взгляд, она здесь не вполне уместна. Более корректно говорить о том,

что формальная кинетика электродного отвечает образованию интермедиата, который далее необратимо превращается в конечный продукт. Сравнить значения с параметрами холестеролоксидазы не следует.

Указанные замечания не снижают общей высокой оценки диссертации. Материалы диссертации прошли прекрасную апробацию на многочисленных конференциях различного уровня. Автореферат и основные публикации полностью отражают содержание диссертации.

Диссертация отвечает специальности «аналитическая химия», поскольку в ней рассмотрены методологические, теоретические и прикладные аспекты создания и использования электрохимических сенсоров (области исследований 2. Методы химического анализа, 4. Методическое обеспечение химического анализа, 8. Методы маскирования, разделения и концентрирования, 10. Анализ органических веществ и материалов и 16. Клинический анализ паспорта специальности).

На основании вышесказанного считаю, что диссертация Козициной А.Н. «Электрохимические сенсорные системы на основе органических и неорганических наноразмерных модификаторов для бесферментного определения клинически значимых соединений» соответствует требованиям пунктов 9-14 Положения о порядке присуждения ученых степеней, предъявляемым к докторским диссертациям, как научно-квалификационная работа, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области электрохимических сенсоров и иммуносенсоров на основе наноматериалов. Автор работы, Козицина Алиса Николаевна, достойна присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Официальный оппонент,

Заведующий кафедрой аналитической химии

Химического института им. А.М.Бутлерова

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,

д.х.н., профессор

Евтюгин Геннадий Артурович

г.Казань, 420008, ул.Кремлевская, 18

тел. 8-843-2337491,

e-mail: Gennady.Evtugyn@kpfu.ru

27 апреля 2018 г.

