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», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа посвящена разработке универсальных иммуносенсоров для определения бактерий. Так как инфекционные заболевания одни из основных и часто происходящих явлений, то необходимо постоянно проводить детекцию бактерий, причем количественную. В настоящее время детекцию бактерий проводят как традиционным методом – бактериальный посев с подсчетом колоний, так и современными методами – иммуноферментным анализом или методом полимеразной цепной реакции (или ДНК-анализ). Но эти методы или очень длительные, или трудоемкие, дорогие и малопроизводительные. Необходимо существенно упростить и ускорить методы определения бактерий. Это большая и комплексная проблема, нереализованная в настоящее время. Поэтому выбор темы исследования диссертационной работы по созданию иммуносенсоров на бактерии является безусловно актуальным.

Научная новизна исследований и полученных результатов

Работа посвящена разработке бесферментных электрохимических иммуносенсоров для определения бактериальных агентов *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266 с использованием в качестве прямой сигналообразующей метки наночастиц Fe_3O_4.

В работе было впервые проведены и подробно исследованы:

1 методы получения и особенности электрохимических превращений наночастиц магнетита Fe_3O_4 в растворе ацетонитрила, и в результате выбраны условия формирования прямого электрохимического отклика от наночастиц в электрохимическом иммуноанализе бактерий;

2 методы получения и свойства наночастиц магнетита, покрытых пленкой хитозана или 3-аминопропилтриэтоксисилана, и показано, что в апротонной среде данные носители сохраняют электрохимическую активность и могут быть использованы в качестве метки в иммуносенсорах;

3 оптимизированы условия создания иммуносенсоров и определены аналитические характеристики, такие как чувствительность, точность и селективность, для детектирования бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266 в модельных суспензиях, смесях бактерий и реальных пробах биожидкостей.

Степень достоверности результатов исследования

При проведении исследований и создания иммуносенсоров в работе были использованы коммерчески доступные печатные электроды, клетки бактерий и антитела к бактериям. Все исследования проведены Т.С. Сваловой самостоятельно, имеют оригинальность и не вызывают сомнения.

Практическая ценность результатов работы

В данной работе созданы и успешно применены иммуносенсоры для количественного определения бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266. Работа несомненно имеет большое практическое значение. Подтверждением практической ценности работы служит внедрение в практику разработанных иммуносенсоров на предприятии ФБУН ГНЦ «Вектор».

Структура и содержание работы

Диссертация состоит из Введения, Литературного обзора, Экспериментальной части (Аппаратура и техника эксперимента), Обсуждения результатов (две главы), Заключения (Выводов), Списка литературы, Списка сокращений и приложения (акта испытаний). Работа изложена на 150 страницах основного машинописного текста в строгом диссертационном стиле. Иллюстративный материал представлен на 32 рисунке и 11 таблицах. Список использованной литературы содержит 246 источника, включая 60 публикаций за 2016 г.

В разделе «Введение» обозначена актуальность выбранного направления, показана степень разработанности темы исследования, на основании чего определены цели и задачи выполненной работы, сформулированы научная новизна и практическая значимость полученных результатов, приведены данные по апробации работы и публикациях.

Глава 1 «Литературный обзор» представляет собой анализ состояния научных исследований по вопросам создания биосенсоров, прежде всего на бактерии. В главе также рассмотрены особенности иммуносенсоров, как без меток, так и с различными метками и различными способами их детекции. Глава написана хорошим литературным языком, приведены данные по достоинствам и по недостаткам каждых разработанных биосенсоров и отражает современное состояние знаний по биосенсорам на бактерии.

В главе 2 «Экспериментальная часть» приведено описание методов получения реагентов и проведения исследований, прежде всего, процедура получения наночастиц, их модификация хитозаном или 3-аминопропилтриэтилэтоксисиланом, культивирование бактерий и характеристика их свойств, создание электродов и иммуносенсоров на бактерии. Синтез и процесс иммобилизации компонентов описаны подробно и качественно. Экспериментальная часть может быть воспроизведена.

Глава 3 диссертации посвящена обсуждению результатов работы по электрохимическим превращениям наночастиц магнетита в апротонных средах (в ацетонитриле).

В главе 4 приведены данные по созданию электрохимических иммуносенсоров на основе наночастиц магнетита, модифицированных хитозаном или 3-аминопропилтриэтоксисиланом, для определения грамотрицательных и грамположительных бактерий.

В диссертационной работе были подробно исследованы и получены следующие основные результаты:

1) Получены наночастицы магнетита (Fe_3O_4) размером 10 нм, которые модифицированы хитозаном или 3-аминопропилтриэтоксисланом. Структура, состав, размеры и форма наночастиц подтверждены методами электронной микроскопии и ИК-спектроскопии.
2) Показано, что наночастицы магнетита в апротонной среде дают электрохимический отклик и могут быть использованы в качестве метки в иммуносенсорах.
3) Разработаны электрохимические иммуносенсоры с использованием метки наночастиц «Fe_3O_4-хитозан» или «Fe_3O_4-3-аминопропилтриэтоксисилан» для определения бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266 в диапазоне 10 – 105 КОЕ/мл.
4) Определены аналитические характеристики разработанных иммуносенсоров - предел обнаружения составил: для бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 – 9,3 КОЕ/мл, для бактерий *Staphylococcus aureus* B-1266 – 8,7 КОЕ/мл. Относительное стандартное отклонение не превышало 10% и результаты детекции бактерий совпадают с данными ИФА и бактериального посева.

Основные положения и результаты диссертационной работы изложены в 13 публикациях, из которых 2 – статьи в журналах, входящих в международные базы цитирования Scopus и Web of Science. Получен 1 патент РФ на изобретение. В связи с этим, считаю, что научная новизна и практическая значимость работы не вызывает сомнений.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

1) В работе не сделано заключение - какие наночастицы магнетита, модифицированных хитозаном или 3-аминопропилтриэтоксисиланом лучше использовать для детекции бактерий? Насколько важно чем модифицировать поверхность наночастиц магнетита, или более важно – какие антитела использовать для иммуносенсора? Будут ли такие иммуносенсоры универсальными и для детекции других бактерий?

2) На стр. 31 - Образование иммунокомплекса «антиген-флуоресцентная метка-антитело» происходит в течение нескольких минут в объеме анализируемой пробы. Это не корректно сформулированное заключение. Иммунный комплекс – это комплекс антител с антигеном (меченным или не меченным). В растворе иммунный комплекс практически сразу образуется, а не в течение нескольких минут…. все зависит от аффинности антител, констант скорости образования и диссоциации

3) На стр. 31 при описании метода поляризационного флуоресцентного иммуноанализа приводится – «Недостатком метода является вероятность получения ложных результатов вследствие неспецифического флуоресцентного свечения компонентов матрицы». Этот недостаток не столько для метода ПФИА, а для всех иммунных методов – все иммунные методы могут давать ложно-положительные результаты из-за влияния матрикса образца.

4) На стр. 32 указано, что «Наиболее известный пример гетерогенного иммуноанализа, имеющий широкое практическое применение – метод иммуноферментного анализа [94]». Однако иммуноферментный анализ может быть и гомогенным – EMIT – метод по модуляции активности фермента.

5) На стр. 38 опечатка – «иммуносенсор для определения артразина» - для определения атразина

6) На стр. 65 дается, что «После каждого измерения рабочий электрод механически очищали от модифицирующего слоя наночастиц». Насколько это сказывается на времени анализа и на воспроизводимости?

7) По результатам работы делается заключение, что «Наибольшей седиментационной и агрегативной устойчивостью обладают наночастицы магнетита, модифицированные хитозаном». Значит ли это, что такие частицы предпочтительнее использовать для создания иммуносенсора?

В целом же приведенные замечания не столь важны и принципиальны, а носят лишь рекомендательный характер, и не снижают высокую оценку данной работы. Научная новизна и прикладное значение диссертационной работы не вызывает сомнения. Материал диссертации изложен последовательно, результаты каждого раздела диссертационной работы взаимно дополняют и логически развивают положения, выдвинутые автором ранее. Основная часть результатов обобщена в виде рисунков и таблиц. Обсуждение результатов изложено подробно. Результаты опытов достоверны, научные положения и сформулированные выводы логично вытекают из экспериментальных данных. В целом, работа представляет собой законченное исследование.

Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Заключение по диссертационной работе

Таким образом, данная диссертация является завершенной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи по разработке бесферментных электрохимических иммуносенсоров, имеющей большое значение и перспективу практической реализации.

Диссертация Т.С. Сваловой на тему «Разработка электрохимических иммуносенсоров для определения бактерий Escherichia Coli и Staphylococcus Aureus с использованием наночастиц Fe_3O_4 в качестве прямой сигналообразующей метки» по своей актуальности, научной значимости и ценности полученных результатов соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сама автор, Татьяна Сергеевна Свалова, заслуживает присуждения ей искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

18 мая 2016 г.

Доктор химических наук, профессор,
ведущий научный сотрудник
кафедры химической энзимологии
Химического факультета
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»
119991, Москва, Ленинские Горы, 1
Тел.: +7 (495) 939-41-92, +7 ([redacted]4
E-mail: saeremin@gmail.com

Сергей Александрович Еремин

Подпись Еремина Сергея Александровича заверяю:
декан Химического факультета
ФГБОУ ВО «Московский государ[redacted]
университет имени М.В.Ломонос[redacted]
академик РАН Валерий Васильевич Лунин