

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 212.285.09 НА БАЗЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО АВТОНОМНОГО  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «УРАЛЬСКИЙ  
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ПЕРВОГО ПРЕЗИДЕНТА  
РОССИИ Б.Н.ЕЛЬЦИНА», МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ  
УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК  
аттестационное дело № \_\_\_\_

решение диссертационного совета от 13 октября 2015 г. № 15

О присуждении Малышевой Наталье Николаевне, гражданство Российской Федерации, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Разработка иммуносенсора для определения *Escherichia coli* и антигена вируса кори с использованием нанокompозитов на основе  $Fe_3O_4$ » по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия принята к защите 15 июля 2015 г., протокол № 12 диссертационным советом Д 212.285.09 на базе ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина», Минобрнауки России, 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19; созданного приказом Минобрнауки России № 105/нк от 11.04.2012 г.

Соискатель, Малышева Наталья Николаевна, 1985 года рождения.

В 2009 г. окончила магистратуру ГОУ ВПО «Уральский государственный университет им. А.М.Горького» по направлению «Химия», в 2012 г. окончила очную аспирантуру ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина» по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия; работает в должности электроника I категории испытательной аналитической лаборатории Химико-технологического института ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный

университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина», Минобрнауки России.

Диссертация выполнена на кафедре аналитической химии ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина», Минобрнауки России.

**Научный руководитель** – доктор химических наук, профессор, Матерн Анатолий Иванович, ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина», Химико-технологический институт, кафедра аналитической химии, заведующий кафедрой.

Официальные оппоненты:

**Евтюгин Геннадий Артурович**, доктор химических наук, профессор, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Химический институт им. А.М. Бутлерова, кафедра аналитической химии, заведующий кафедрой;

**Стожко Наталия Юрьевна**, доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВПО «Уральский государственный экономический университет» (г.Екатеринбург), Институт торговли, пищевых технологий и сервиса, кафедра физики и химии, заведующий кафедрой,

дали положительные отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация** – ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г. Уфа – в своем положительном заключении, подписанном Майстренко Валерием Николаевичем, доктором химических наук, профессором, заведующим кафедры аналитической химии Химического факультета, указала, что диссертационная работа Малышевой Натальи Николаевны по актуальности решаемой проблемы, объему проведенных исследований, уровню их обсуждения и научной значимости соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, и может рассматриваться как завершенная научно-квалификационная работа, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное

значение для развития методов бесферментного электрохимического иммуноанализа, а именно, разработка электрохимического иммуносенсора с использованием нанокompозитов на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  для определения инфекционных агентов. Малышева Наталья Николаевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Соискатель имеет 19 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 19 работ, опубликованных в рецензируемых научных журналах – 3.

Другие публикации представлены в виде 2 патентов Российской Федерации на изобретения, 2 статей в сборниках научных трудов (2), 12 тезисов докладов опубликованных в материалах международных (5) и российских (7) научных конференций.

Общий объем опубликованных по теме диссертации работ 9,37 п.л., авторский вклад – 2,37 п.л.

Наиболее значительные научные работы по теме диссертации:

1. Малышева, Н.Н. Бесферментный электрохимический метод определения *E.coli* с использованием нанокompозитов  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  с оболочкой  $\text{SiO}_2$ , модифицированной ферроценом / А.Н. Козицина, Н.Н. Малышева, И.А. Утепова, Ю.А. Глазырина, А.И. Матерн, Х.З. Брайнина, О.Н. Чупахин // Журнал аналитической химии. – 2015. – Т. 70. – № 5. – С. 1-7.

2. Малышева, Н.Н. Бесферментный электрохимический метод определения антигена вируса кори с использованием синтезированных конъюгатов  $\text{IgG} - (\text{Fe}_3\text{O}_4 - \text{SiO}_2)$  в качестве сигналообразующей метки / Н.Н. Малышева, Ю.А. Глазырина, В.О. Ждановских, Т.С. Свалова, А.И. Матерн, А.Н. Козицина // Известия РАН. Серия химическая. – 2014. – № 7. – С. 1633-1638.

3. Малышева, Н.Н. Синтез и исследование электрохимических превращений магнитных нанокompозитов на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  / А.Н. Козицина, Н.Н. Малышева, Е.В. Вербицкий, И.А. Утепова, Ю.А. Глазырина,

Т.С.Митрофанова, Г.Л. Русинов, А.И. Матерн, О.Н. Чупахин, Х.З. Брайнина // Известия РАН. Серия химическая. – 2013. – № 1. – С. 2327-2336.

4. Пат. 2542487 РФ. МПК C12Q 1/04, C12N 1/02, G01N 33/53, B82B 1/00  
Способ определения содержания грамотрицательных патогенных бактерий в анализируемой среде / Козицина А.Н., Малышева Н.Н., Глазырина Ю.А., Матерн А.И.; заявл. 15.07.2013; опубл. 20.02.2015, бюл. № 5.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

1. **Мирошниковой Елены Геннадьевны**, кандидата химических наук, доцента, доцента кафедры физики и химии ФГБОУ ВПО «Уральский государственный экономический университет», г. Екатеринбург. В отзыве имеются вопросы:

– стр. 19. Поясните, как проводили разрушение иммунокомплекса методом кислотного разложения;

– насколько стабильны во времени характеристики предложенных сенсоров?

– как соотносятся длительность и затратность предложенного метода электрохимического иммуноанализа по сравнению с существующими (ИФА, ПЦР)?

2. **Хариной Галины Валерьяновны**, кандидата химических наук, доцента кафедры металлургии, сварочного производства и методики профессионального обучения ФГАОУ ВПО «Российский государственный профессионально-педагогический университет», г. Екатеринбург. В отзыве имеются вопросы:

– на стр. 3 автореферата при обсуждении недостатков метода ИФА не совсем ясно, применения чего требует метод ИФА «при хранении ферментов»;

– как влияет природа электроактивного полимерного покрытия нанокompозита на величину потенциала электрохимического отклика аналитического сигнала?

– чем объяснить высокую проникающую способность в цитоплазму частиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  - ПП в отличие от частиц частицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  - ХПВБХ?

– каковы преимущества разработанного метода иммуноанализа по сравнению с «сэндвич» - вариантом ИФА, который отличается высокой чувствительностью, превосходящей возможности других схем ИФА?

– рассматривался ли вопрос о применении предлагаемого метода для определения бактерий в биологических объектах?

**3. Трубачева Алексея Владиславовича**, кандидата химических наук, доцента, ведущего научного сотрудника ФГБУН Институт механики Уральского отделения РАН, г. Ижевск. В отзыве имеются замечания:

– из текста автореферата непонятно, какова природа электрохимического отклика, используемого при определении содержания бактерий *E.coli* и антигена вируса кори, каков характер электродного процесса, лежащего в основе его формирования, какова природа соответствующего предельного тока?

– следует пояснить, чем обусловлены селективность и специфичность разработанного электрохимического метода иммуноанализа, почему не происходило формирование иммунокомплекса на поверхности ТГЭ [толсто пленочного графитопоксидного электрода] с участием бактерий других видов в отличие от бактерий *E.coli*?

**4. Кучменко Татьяны Анатольевны**, доктора химических наук, профессора, заведующей кафедрой физической и аналитической химии и **Шуба Анастасии Александровны**, кандидата химических наук, ассистента кафедры физической и аналитической химии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий». В отзыве имеются замечания и вопросы:

– в тексте автореферата часто встречается фраза о «разработке электрохимического метода иммуноанализа», хотя из текста автореферата следует, что разработаны иммуносенсор, методики и способ иммуноанализа

с применением вольтамперометрического метода. Использование такой терминологии некорректно либо требует пояснения;

– автором было синтезировано и исследовано три вида наночастиц магнетита с различными полимерными покрытиями, однако для практического использования выбран только один вид (с оксидкремниевым покрытием). Возможно ли применение и в каких областях анализа других синтезированных нанокompозитов?

– замечание относится к оформлению автореферата: на стр. 10 отсутствует пункт 3 в разделе основные результаты, при описании разработанных методик для удобства и наглядности восприятия материала нужно было привести градуировочные графики с соответствующими метрологическими характеристиками;

– апробация разработанного иммуносенсора проводилась на реальных объектах природного происхождения (воздух и вода), однако в цели работы указана также возможность анализа биологических объектов, которые по своему составу являются более сложными. Возможно ли применение разработанных автором методик по определению бактерии и антигенов вирусов в биопробах, например, в крови?

**5. Инжеватовой Ольги Владимировны**, кандидата химических наук, доцента кафедры металлургии, сварочного производства и методики профессионального обучения ФГАОУ ВПО «Российский государственный профессионально-педагогический университет», г. Екатеринбург. По автореферату имеются следующие вопросы и замечания:

– в вольтамперометрии применяются различные режимы регистрации аналитического сигнала. Режим циклической вольтамперометрии является далеко не самым чувствительным из них. Требуется дополнительное пояснение выбора данного режима регистрации аналитического сигнала;

– на рис.8 приведены микрофотографии ультратонкого среза клеточной культуры *E.coli* после инкубации с нанокompозитными частицами трех

типов. В чем причина такой разной степени проникновения частиц в клеточную мембрану?

– линейные зависимости аналитического сигнала от десятичного логарифма концентрации бактерий *E.coli* (стр.16) и антигена вируса кори (стр.19) не экстраполируются в нулевую точку, о чем и говорит отрицательное значение отрезков этих зависимостей. Чем это вызвано?

– хотелось бы видеть в работе данные сравнительного анализа определения антигена вируса кори с использованием предложенной методики и другими методами.

**6. Носковой Галины Николаевны**, доктора химических наук, зам. директора ООО «Научно-производственное предприятие «Томьаналит», г. Томск. В отзыве имеются вопросы:

- почему для электрохимических исследований были выбраны нанокompозиты на основе данных, полученных при электронно-микроскопических исследованиях? Какие критерии использовали для выбора? Возможно, целесообразнее было бы выбрать нанокompозиты на основании электрохимических исследований, что позволило бы установить влияние степени агрегированности, размера, толщины и равномерности покрытия на электрохимический отклик;

- понятен и обоснован выбор эталонного референс-штамма *Escherichia coli* ATCC 25922 в качестве примера бактерий при разработке бесферментного электрохимического иммуносенсора и метода для количественного определения бактерий. Исследовались ли в работе другие штаммы *E.coli*, например 0157:H7?

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их компетентностью в области электроаналитической химии и, в частности, разработки электрохимических сенсоров и методов для определения различных классов аналитов, что подтверждается публикациями в рецензируемых научных журналах.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

– **разработаны** новые методики получения стабильных во времени электрохимически активных нанокompозитов на основе  $Fe_3O_4$  с хинолин-модифицированным поливинилбензилхлоридным покрытием, покрытием из полипиррола, ферроценмодифицированным оксидкремниевым покрытием с узким распределением по размерам, определенной формы, состава, структуры;

– **предложены** оригинальные подходы для определения бактерий (на примере *E.coli*) и антигенов вирусов с использованием разработанного иммуносенсора и алгоритма гибридного иммуноэлектрохимического способа анализа, с применением синтезированных электрохимически активных нанокompозитных частиц в качестве сигналообразующей метки;

– **доказана** перспективность использования разработанного иммуносенсора и способа иммуноанализа в небольших лабораториях;

– теоретические выкладки и трактовка результатов исследования проводилась в рамках принятых в науке **понятий и терминов**.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:**

– **доказано**, что размер синтезированных нанокompозитных частиц зависит от используемого метода полимеризации, а степень и скорость их проникновения в клетку бактерии *E.coli* зависит от природы покрытия нанокompозита;

– **применительно к проблематике диссертации результативно использован** комплекс различных методов синтеза и модификации нанокompозитных частиц, современной аппаратуры и методов обработки результатов экспериментов при разработке сенсора и способа иммуноанализа, позволивший установить линейную зависимость между прямым электрохимическим откликом «метки» (нанокompозита), входящей в состав иммунокомплекса, и концентрацией бактерий в пробе;

– **изложены** доказательства применимости разработанного способа к анализу реальных объектов (проб воды и воздуха) для специфического количественного детектирования бактерий *E.coli* в диапазоне концентраций  $2.3 \cdot 10^2 - 2.3 \cdot 10^7$  КОЕ/мл;

– **раскрыта** взаимосвязь между величиной прямого электрохимического отклика нанокompозита – «метки», входящей в состав иммунокомплекса, и концентрацией бактерий *E.coli* в пробе;

– **изучено** взаимодействие бактерии *E.coli* с нанокompозитными частицами на основе  $Fe_3O_4$  с хинолин-модифицированным поливинилбензилхлоридным покрытием, покрытием из полипиррола, ферроценмодифицированным оксидкремниевым покрытием и доказано различие в степени проникновения трех типов частиц в клетку бактерии;

– **проведена модернизация** электрохимического метода иммуноанализа для определения патогенных микроорганизмов с использованием наночастиц  $Fe_3O_4$ .

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:**

– **разработан** способ иммуноанализа для количественного определения бактерии *E.coli* с использованием в качестве прямой метки синтезированных по оригинальным методикам электроактивных нанокompозитных частиц  $Fe_3O_4$  с оксидкремниевым покрытием, модифицированным ферроценом, разработанный способ защищен патентом Российской Федерации на изобретение;

– **определены** аналитические характеристики разработанных способов иммуноанализа для определения бактерии *E.coli* и антигена вируса кори, позволяющих селективно детектировать бактерии *E.coli* с пределом обнаружения  $1.2 \cdot 10^1$  КОЕ/мл, предел обнаружения для антигена вируса кори –  $1.87 \cdot 10^{-5}$  мг/мл;

– **создан** подход к определению антигенов вирусов методом электрохимического иммуноанализа с использованием синтезированных

конъюгатов антител с нанокompозитными частицами на основе  $Fe_3O_4$  с оксидкремниевым покрытием;

– **представлены** предложения по переносу разработанного способа иммуноанализа на другие виды бактерий и проверке его применимости для анализа таких объектов как кровь и другие биологические жидкости.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:**

– **для экспериментальных работ** использовалось современное сертифицированное высокочувствительное оборудование, доказана воспроизводимость результатов количественного определения целевых аналитов (бактерии *E.coli* и антигена вируса кори);

– **теория** построена на известных фактах, она согласуется с экспериментальными данными, полученными соискателем, а также с опубликованными данными отечественных и зарубежных авторов;

– **идея базируется** как на анализе полученных экспериментальных данных, так и на обобщении передового опыта в области создания сенсоров для определения инфекционных агентов;

– **использовано** сравнение экспериментальных данных соискателя с результатами исследований других авторов;

– **установлено** качественное и количественное совпадение результатов определения содержания бактерии *E.coli* в модельных и реальных объектах с использованием разработанного автором иммуносенсора и традиционно используемых методов иммуноферментного анализа и бактериального посева, выполненных в независимой лаборатории ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (г. Новосибирск);

– **использованы** современные методики сбора и обработки информации в базах данных Scopus, Web of science, EBSCOhost, научной электронной библиотеки eLIBRARY.

**Личный вклад соискателя** состоит в решении ключевых задач, проведении экспериментальных исследований в области синтеза и модификации нанокompозитных частиц, в изучении их электрохимического

поведения, интерпретации, систематизации результатов, разработке способа и сенсора для электрохимического определения бактерии *E.coli* и антигена вируса кори, а также подготовке научных публикаций по теме исследования.

На заседании 13 октября 2015 года диссертационный совет принял решение присудить Малышевой Н.Н. ученую степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 6 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвующих в заседании, из 29 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени – 21, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель

диссертационного совета

Ученый секретарь

диссертационного совета

13.10.2015 г.



Бекетов Аскольд Рафаилович

Ямицкий Леонид Федорович