

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Прибиль Медеи Михайловны
“ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЕ ЛАКТАТНЫЕ БИОСЕНСОРЫ
НА ОСНОВЕ ИНЖЕНЕРИИ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ЛАКТАТОКСИДАЗЫ”,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Разработка высокочувствительных, надёжных и экспрессных методов определения лактата представляет большой интерес. Среди различных методов использование биосенсоров, особенно амперометрических ферментативных электродов, занимает одну из лидирующих позиций, так как специфичность иммобилизованного фермента к своему субстрату позволяет проводить измерения непосредственно в образце, несмотря на сложность его состава, без предварительной пробоподготовки. Это сокращает время анализа, а также расширяет возможные области применения биоустройства. Так, разработка биосенсора на лактат, который способен работать в неразбавленной потовой жидкости человека, имеет огромное значение для неинвазивного мониторинга состояния организма. Такой амперометрический биосенсор может найти свое применение как в спортивной медицине, так и в здравоохранении. Таким образом, актуальность проблемы исследования не вызывает сомнений.

Научная новизна диссертации М. М. Прибиль очевидна, наиболее существенными результатами являются:

1. Применение сканирующей электрохимической микроскопии в качестве нового метода скрининга ферментсодержащих мембран различного состава для улучшения аналитических характеристик биосенсора с целью создания чувствительных и стабильных лактатных биоустройств. Разработанный в работе биосенсор в четыре раза превосходит лучший известный датчик для определения лактата по чувствительности, и в два раза по стабильности.

2. Использование отрицательно заряженного перфторсульфонируемого полимера при иммобилизации лактатоксидазы с целью экранирования субстрат-связывающего участка и понижения сродства фермента к субстрату. Применение смешанных мембран из перфторсульфонируемого полимера и γ -аминопропилсилоксана позволило расширить диапазон определяемых концентраций лактата в область высоких значений вплоть до 80 мМ в периодическом режиме тестирования, что покрывает физиологическое содержание аналита в поте.

3. Разработка системы для непрерывного неинвазивного мониторинга состояния гипоксии. Достоверность результатов по содержанию лактата в поте в состоянии покоя и в

процессе физической нагрузки, полученных при апробации неинвазивного монитора, подтверждена с помощью альтернативного метода.

Практическая значимость диссертационной работы обоснована возможностью использования разработанных биосенсоров для определения лактата в неразбавленных биологических жидкостях человека, что открывает обширные перспективы развития неинвазивной диагностики. Автором создан лабораторный образец неинвазивного монитора состояния гипоксии. Разработанный образец применим для непрерывного определения лактата в поте непосредственно с поверхности кожи в состоянии покоя, а также в процессе физической нагрузки. Помимо этого, разработан и апробирован высокостабильный и чувствительный микроэлектрод для определения пероксида водорода, используемый в качестве зонда для сканирующего электрохимического микроскопа.

В целом диссертационная работа построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 163 страницах печатного текста, включающего 81 рисунок и 10 таблиц. Список цитированной литературы насчитывает 207 наименований, большинство из которых статьи зарубежных авторов, опубликованные в журналах с высоким импакт-фактором.

Во введении, помимо общей характеристики работы и изложения актуальности темы диссертации, также сформулированы цели и задачи исследования. Основная цель работы состояла в создании высокоэффективных лактатных биосенсоров на основе инженерии лактатоксидазы при ее иммобилизации с возможностью адаптации их на различные диапазоны содержания лактата, в частности для разработки неинвазивного монитора состояния гипоксии.

Первая глава диссертационной работы содержит обзор литературы, состоящий из пяти частей. В первой части описываются важность и методы определения лактата, включая неинвазивный мониторинг биоаналита. Во второй части – электрохимические биосенсоры, а именно их принцип действия, классификация и аналитические характеристики. Третья часть обзора литературы посвящена описанию электрокатализаторов окисления и восстановления пероксида водорода. В четвертой части рассматриваются вопросы иммобилизации ферментов при конструировании биосенсоров. Пятая часть посвящена сканирующей электронной микроскопии.

Во второй главе представлена экспериментальная часть диссертационной работы: материалы, оборудование и методы.

В третьей главе представлены непосредственно экспериментальные результаты диссертационного исследования, а также их обсуждение. Экспериментальная часть работы изложена четко, очень подробно, и не оставляет сомнений в надежности использованных методов и достоверности полученных результатов. В качестве новых научных результатов диссертантом выдвинуты следующие положения:

- Создан высокостабильный микросенсор на основе берлинской лазури для определения пероксида водорода и интегрирован в сканирующий электрохимический микроскоп, что впервые позволило использовать метод сканирующей электрохимической микроскопии для скрининга ферментсодержащих мембран. Установлен оптимальный состав смеси для иммобилизации лактатоксидазы, обеспечивающий наивысшую активность и стабильность включенного в мембрану фермента.

- Создан высокочувствительный и высокостабильный биосенсор для определения лактата на основе мембраны из γ -аминопропилсилоксана для иммобилизации фермента с использованием берлинской лазури, как наиболее эффективного трансдьюсера на пероксид водорода. Диапазон определяемых концентраций лактата $1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-3}$ М, чувствительность достигает $0.33 \text{ А М}^{-1} \text{ см}^{-2}$. В сравнении с наилучшим известным лактатным датчиком, чувствительность разработанного биосенсора выше в четыре раза, а операционная стабильность улучшена в два раза. Биосенсор сохраняет по крайней мере 80% от исходной величины чувствительности при хранении в течение 18 месяцев.

- Для пролонгирования диапазона определяемых содержаний лактата в область более высоких концентраций при иммобилизации лактатоксидазы предложено использовать отрицательно заряженный перфторсульфонированный полимер. Это позволило увеличить кажущуюся константу Михаэлиса лактатоксидазы в 30 раз по сравнению с таковой при использовании электронейтральных силоксановых мембран для иммобилизации фермента.

- Разработан лактатный биосенсор, работающий в области высоких (миллимолярных) концентраций лактата, за счет использования смешанных мембран из γ -аминопропилсилоксана и перфторсульфонированного полимера для иммобилизации лактатоксидазы. Диапазон определяемых концентраций лактата сдвинут в область более высоких значений на два порядка и составляет в периодическом режиме 0.1 – 80 мМ, а в системе проточно-инжекционного анализа: $1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-1}$ М, чувствительность $1.6 \text{ мА М}^{-1} \text{ см}^{-2}$. После четырёх часов непрерывной работы в периодическом режиме биосенсор сохраняет 100% исходной активности, и даже спустя 9 ч измерений обеспечивается по крайней мере 50% от первоначального отклика.

- Создан неинвазивный монитор состояния гипоксии, позволяющий непрерывно определять лактат в поте. Достоверность результатов по содержанию лактата в поте в состоянии покоя и в процессе физической нагрузки, полученных при апробации монитора, подтверждена с помощью альтернативного метода, коэффициент корреляции $R > 0.99$.

В целом, результаты, полученные автором, являются новыми научными знаниями в области аналитической химии. Основные результаты диссертации опубликованы в трех печатных работах. Помимо этого, результаты диссертационной работы обсуждались на двух Российских конференциях, а также Российском съезде аналитиков и получили одобрение ведущих специалистов.

Диссертационная работа Прибиль М.М. является законченным научным исследованием, выполненным автором на высоком научном уровне. Полученные результаты достоверны, выводы и заключения обоснованы. Работа базируется на достаточном числе исходных данных, примеров и расчетов. Она написана грамотным языком и аккуратно оформлена.

Автореферат соответствует основному содержанию диссертации.

При прочтении диссертационной работы и автореферата возникло только два незначительных замечания:

1. При цитировании литературных источников имеются определенные неточности. Например, ссылка номер 100 на странице 31 диссертации является, скорее всего, опечаткой.

2. В оформлении работы имеются определенные несоответствия общим требованиям к оформлению кандидатских и докторских диссертаций. Так, согласно ГОСТ Р 7.0.11-2011, перечень сокращений, использованных в диссертации помещают после основного текста перед списком литературы. Слева в алфавитном порядке или в порядке их первого упоминания в тексте приводят сокращения или условные обозначения, справа – их детальную расшифровку.

Сделанные замечания не меняют общего положительного впечатления о выполненной работе и абсолютно не снижают ее научной и практической ценности. Представленная к защите диссертационная работа является законченной научно-квалификационной работой, выполненной автором на высоком научном уровне.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 02.00.02 – Аналитическая химия и направлена на развитие практических и теоретических основ создания высокоэффективных биосенсоров. По актуальности решаемых задач, научной новизне, высокому научному уровню исполнения и важности практических рекомендаций диссертация Прибиль М.М. “Высокоэффективные лактатные биосенсоры на основе

инженерии иммобилизованной лактатоксидазы” соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным п. 9 “Положения о порядке присуждения ученых степеней”, утвержденного в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 24-го сентября 2013 года № 842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

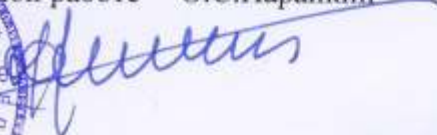
Ведущий специалист лаборатории "Белковая фабрика" Курчатовского комплекса НБИКС-технологий, НИЦ "Курчатовский институт"

д.х.н.



Шлеев Сергей Валерьевич
(916)-1328601
sergey.shleev@mah.se

Подпись С.В. Шлеева *доверяю*
Первый заместитель директора по научной работе О.С.Нарайкин



14 сентября 2015 года

Россия, Москва 123098, пл. Академика Курчатова, д.1,
НИЦ "Курчатовский институт"
www.nrcki.ru