

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Прибиль Медеи Михайловны «Высокоэффективные лактатные биосенсоры на основе инженерии иммобилизованной лактатоксидазы» на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

**Актуальность работы.** Лактат является важным метаболитом, свидетельствующим увеличением своей концентрации в биологических жидкостях о состоянии гипоксии организма. В свою очередь, это может быть признаком ряда патологий или избыточной физической нагрузки, вызвавшей локальный ацидоз мышц. По указанным причинам периодический или непрерывный мониторинг лактата имеет большое значение для спортивной медицины и контроля состояния здоровья пациентов в целом. Помимо этого, анализ лактата востребован в контроле производства продуктов естественного брожения. Ферментные сенсоры, использующие для количественной оценки лактата его превращение в соответствующей каталитической реакции и регистрацию количества выделяющегося продукта, занимают особое место в перспективных средствах медицинской диагностики в силу удобного формата измерения, портативности соответствующей измерительной техники и оперативности предоставления информации, не сопряженной с трудоемкими стадиями подготовки пробы. Тем не менее, несмотря на достаточно большое число работ, посвященных ферментативному анализу лактата, целый ряд проблем, связанных с недостаточной стабильностью фермента и низким верхним порогом измеряемых концентраций, остаются нерешенными. Частично они связаны с развитием биосенсоров для неинвазивной диагностики и диктуются достаточно высокими содержаниями лактата в поте, выделяющемся при интенсивной мышечной деятельности. Учитывая вышесказанное, тема диссертации М.М. Прибиль, посвященная созданию лактатного биосенсора с учетом вышеназванных требований чувствительности сигнала путем оптимизации способа иммобилизации лактатоксидазы и регистрации аналитического сигнала медиаторного восстановления пероксида водорода, является *актуальной, научно и практически значимой*.

**Структура диссертации.** Работа изложена на 163 страницах текста компьютерной верстки, содержит 81 рисунок и 10 таблиц. В списке цитированных библиографических источников – ссылки на 207 работ отечественных и зарубежных авторов. Диссертация построена традиционным способом и состоит из Введения, Обзора литературы, разбитого на 5 глав, Экспериментальной части и Результатов и обсуждения (3 главы), содержащих собственные результаты автора.

*Введение* содержит обоснование выбранной темы исследования, описание поставленных перед исследователем задач, положения, составляющие научную новизну и практическую значимость, положения, выносимые на защиту, а также сведения об апробации полученных результатов на конференциях различного уровня.

*Обзор литературы* включает три основные части, а именно, обоснование важности анализа лактата в медицинских целях и краткую характеристику существующих методов такого анализа, различные аспекты создания биосенсоров с основным вниманием к способу регистрации сигнала и иммобилизации лактатоксидазы. Кроме того, представлены основы достаточно нового и пока редкого в России метода электрохимической сканирующей микроскопии. Обзор в целом отражает современное состояние проблемы создания лактатного биосенсора и обосновывает выбор заявленной темы исследования, однако написан неровно по уровню подачи материала и степени его обобщения. Вызывает некоторые сомнения компоновка составных частей, когда общее описание биосенсоров, их классификация и основы амперометрического измерения сигнала следуют после сведений о лактатных биосенсорах. Удачно представление данных в виде обобщающей таблицы 1, к сожалению, включающей не все упомянутые по тексту источники.

*Экспериментальная часть* содержит описание использованных в работе реактивов и основных методов исследования, включая многочисленные фотографии и иллюстрации использованного оборудования. Значительная часть работ, связанных с применением планарного печатного графитового электрода для иммобилизации фермента и проведения измерений, в том числе, в потовых выделениях и в потоке, выполнена на оригинальных установках, разработанных автором или в лаборатории, в которой сделана работа. Степень полноты представления данных, а также разнообразие методов, использованных для характеристики нативного и иммобилизованного фермента, позволяют сделать заключение о *достоверности* полученных с их помощью результатов.

Собственные результаты М.М.Прибиль представлены в трех заключительных главах, посвященных последовательно применению силоксановых мембран, определению высоких концентраций лактата и созданию неинвазивного датчика лактата в потовых выделениях.

В качестве преобразователя сигнала автор использовал печатный графитовый электрод, модифицированный берлинской лазурью – одним из наилучших медиаторов электронного переноса, обеспечивающим максимальную чувствительность регистрируемого тока восстановления к пероксиду водорода. Большая популярность берлинской лазури и ее применение в составе оксидоредуктазных биосенсоров, в первую очередь, связаны с успехами в этой области, достигнутыми под руководством научного руководителя диссертанта. Вторым слагаемым успеха стала успешная реализация другого методического приема, появившегося впервые также в МГУ, на кафедре химической энзимологии. Речь идет об использовании неводных сред для получения ферментсодержащих мембран. В данном случае исходным материалом служил раствор фермента и силксана или смеси силксана и аналога нафтона. Автор провел поиск оптимального состава мембраны, привлекая для этого такой нетрадиционный инструмент, как электрохимическая сканирующая

шая микроскопия. В качестве зонда предложено использовать гибкие электроды, изготавливаемые с помощью лазерной абляции с заполнением полученного канала углеродной пастой. Представлены данные, свидетельствующие о высокой чувствительности и устойчивости сигнала полученного таким образом электрохимического зонда на пероксид водорода, что свидетельствует о работоспособности предложенного способа изготовления электрода. В результате были получены профили концентрации пероксида водорода, двумерные и трехмерные изображения поверхности силиконовых мембран с четким выделением областей генерации пероксида водорода с микронным разрешением. На основании визуального сравнения полученных изображений и сопоставления результатов с данными измерения классическим амперометрическим способом с установлением коэффициента чувствительности по наклону графика был выбран состав мембран, отвечающий поставленным критериям характеристик биосенсора. Для объяснения наблюдаемого экстремума кажущейся (экспериментально определенной) активности фермента от концентрации 3-аминопропилтриэтоксисилана автор дополнительно исследовал полученные золь-гель методом мембраны с помощью сканирующей электронной микроскопии, лазерной микроскопии и профилометрии. Результатом явилось обоснование оптимального состава мембраны и предположения о факторах, его определяющих. Полученный с такими мембранами биосенсор показал высокую устойчивость и воспроизводимость сигнала в пределах трех порядков концентрации аналита при пределе обнаружения в  $9 \times 10^{-7}$  М.

Вторая часть исследования посвящена противоположной задаче – увеличению определяемых концентраций лактата, что необходимо для его прямого определения в потовых выделениях. Для этого в качестве матрицы мембраны использовали ПФС – аналог нафтона, который образует полиионный комплекс с ферментом, экранируя положительно заряженные остатки аргинина в его активном центре. Эксперименты с чистым ПФС показали отсутствие ферментативной активности в мембране. Скрининг мембран различного состава с помощью электрохимической сканирующей микроскопии позволил выбрать оптимальные сочетания двух носителей – полисилоксана и ПФС, которые обеспечили требуемое снижение количества генерируемого пероксида водорода и отвечающего ему катодного тока зонда. Установление оптимального соотношения полимеров потребовало весьма значительного по объему эксперимента, но и результат впечатляет: диссертанту удалось сдвинуть калибровочную кривую лактата почти на три порядка величины в сторону более высоких концентраций, с лихвой закрыв требуемый интервал в 5-80 мМ, характеризующий концентрацию аналита в потовых выделениях при большой физической нагрузке. Надо отметить, что область максимума кажущейся константы Михаэлиса на трехмерной диаграмме достаточно узкая, чем и объясняется потребность в столь дробном изменении концентраций компонентов мембран. Разработанный лактатный биосенсор по-

казал устойчивые операционные характеристики при работе в прочно-инжекционном режиме и при длительном хранении.

И наконец, в третьей части работы приведено описание результатов по испытанию разработанного лактатного биосенсора на высокие концентрации лактата в составе потосборного устройства для неинвазивного мониторинга уровня лактата. Для этого была использована оригинальная тонкопленочная ячейка в сочетании с капиллярным потосборным устройством, обеспечивающим подток потовых выделений к планарному электроду. Устройство было протестировано на различных уровнях мышечной нагрузки испытуемого и в сравнении с независимыми методами контроля показало надежность получаемых результатов определения лактата.

*Выводы*, сделанные по работе, логичны и следуют из представленных результатов и их обсуждения. Содержание диссертации полностью отражено в публикациях и адекватно представлено в автореферате. Постановка задачи, планирование и проведение эксперимента и его обсуждение выполнены лично автором.

Характеризуя работу М.М.Прибиль в целом, следует отметить, что это современное исследование в актуальной для аналитической химии и медицинской диагностики области, в котором благодаря комплексу современных физико-химических методов исследования получены новые результаты, расширяющие потенциальные возможности применения лактатных биосенсоров.

**Научная новизна.** К числу положений, составляющих научную новизну проведенного исследования, следует, прежде всего, отнести комплекс закономерностей типа «структура – свойство», связывающих особенности состава и морфологии полученных полимерных мембран с параметрами ферментативной реакции. Это позволило направленно менять характеристики биосенсоров в зависимости от поставленной задачи – снижать интервал определяемых концентрации при использовании силоксановых мембран и увеличивать – при введении в состав мембраны дополнительного компонента - отечественного аналога наффона. Достигнутые в обоих случаях характеристики определения лактата, как и параметры стабильности фермента при хранении, превосходят описанные на сегодняшний день аналоги. Использованный прием искусственного «загрубления» биосенсора, связанный с введением полианионного компонента, по-видимому, может быть с успехом применен и для других ферментов, что выводит достоинства проведенного исследования за рамки только лактатоксидазы и только лактата.

**Практическая значимость** исследования связана с великолепной демонстрацией возможностей разработанных биосенсоров в реальных задачах медицинской диагностики, включая создание вполне работоспособного прототипа устройства непрерывного мониторинга потовых выделений с помощью неинвазивного биосенсора. Великолепны отдельные находки, касающиеся изготовления буквально на коленке тонкопленочных и микро-

канальных ячеек со вполне воспроизводимыми характеристиками. Наконец, методически достаточно интересно, хотя и не бесспорно применение в качестве средства скрининга электрохимической сканирующей микроскопии.

К работе имеется ряд недостатков, связанных с некоей небрежностью оформления и отдельными непринципиальными моментами обсуждения.

1. В рамках данной работы применение метода электрохимической сканирующей микроскопии представляется не вполне оправданным. Если бы речь шла о микросенсорах, точно позиционирование области протекания ферментативной реакции имело бы определенный смысл. При миллиметровых размерах электрода и необходимости подтверждения результатов скрининга «обычной» вольтамперометрией остается вопрос, в чем принципиальная новизна информации, получаемой именно при сканировании?

2. Говоря о механизме влияния состава полимерной мембраны на ферментативную реакцию, автор апеллирует к результатам, полученным с помощью сканирующей электронной микроскопии и лазерной микроскопии. При этом (а) условия функционирования фермента в мембране в водном растворе предполагают ее естественную поляризацию и набухание, в зондовой микроскопии не учитываемые, и (б) автор не приводит характеристик размерного распределения установленных элементов структуры по полю микроэлектрода. Если говорить о толщине, рельефе и пр., важно знать не только средние значения, но и вариации указанных параметров относительно аналогичных вариаций электропроводящего слоя. Это не говорит о том, что автор неверно трактует полученные результаты, но и причинно-следственная связь между фотографиями и характеристиками сигнала биосенсоров на взгляд оппонента не столь однозначна.

3. Говоря о преимуществе регистрации катодного тока восстановления пероксида водорода в присутствии берлинской лазури (что под сомнение не ставится), автор дважды упоминает о том, что низкий рабочий потенциал (0.00 В) позволяет не учитывать присутствие в биологической пробе восстановителей, таких как аскорбат, урат и пр. (см. стр.21). На самом деле аскорбиновая и мочевая кислота просто не восстанавливаются на электроде, они мешают при регистрации анодных токов окисления деполяризаторов. При этом остается гипотетическая возможность, что природные антиоксиданты будут параллельно электроду восстанавливать пероксид водорода, что также повлияет на сигнал.

Автор достаточно вольно использует терминологию, что создает некоторые проблемы в понимании. Например, аффинность активного центра к субстрату предполагает рассмотрение конкретной пары фермент – субстрат, говорить о влиянии диффузионных факторов на аффинность в классическом понимании, наверное, неточно. Хотя понятно, что автор имеет ввиду различную степень искажения «истинной» аффинности под влиянием массопереноса. Ассоциировать скорость ферментативной реакции с величиной тока, относящегося к продукту ферментативной реакции, можно лишь в рамках линейной ап-



проксимации соответствующей концентрационной зависимости. Автор часто употребляет термин «силоксан». Исходное соединение – 3- аминопропилтриэтоксисилан, варьирование процентного содержания относится к взятым его количествам, но силоксан – продукт его поликонденсации, где за счет выделения этанола массовая доля силоксана в продукте становится ниже, чем исходного соединения.

4. К сожалению, приходится констатировать технические огрехи – дубли рисунков (схема реакции лактатоксидазы, принципы электрохимической сканирующей микроскопии), перенос цитируемого материала из литобзора в содержательные главы. Встречаются повторы некоторых фраз, причем, не относящихся к существу самой работы – о первом глюкозном электроде, о природе медиаторов при определении пероксида водорода. Автор не всегда приводит стандартные отклонения экспериментальных значений, ограничиваясь указанием на число параллельных измерений.

Указанные результаты не меняют общей положительной оценки диссертации. О высокой значимости полученных результатов свидетельствует и публикация статей в высокорейтинговых международных журналах, входящих в системы Scopus и Web of Science (всего три публикации), и прекрасная апробация результатов на конференциях.

Считаю, что представленная диссертация Прибиль Медеи Михайловны «Высокоэффективные лактатные биосенсоры на основе инженерии иммобилизованной лактатоксидазы» соответствует специальности 02.00.02 – аналитическая химия и удовлетворяет требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением № 842 Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года, как научно-квалификационная работа, в которой содержится решение задачи, имеющей значение для развития ферментативных методов анализа. Автор достоин 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»,

д.х.н. (02.00.02 – аналитическая химия), профессор

г.Казань, 420008, ул.Кремлевская, 18

тел. 8-843-2337491,

e-mail: Gennady.Evtugyn@kpfu.ru

 Г.А.Евтюгин



09.09.2015

