

Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии им. А.Н.Баха  
Российской академии наук

119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, стр.2  
Тел.. 954-52-83, факс: 954-27-32

14.09 2015 № 12307-2171-632  
на № 7 ул а/х от 04.09.2015

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

Федерального исследовательского центра  
«Фундаментальные основы биотехнологии»

Российской академии наук  
чл.-корр. РАН, профессор

В.О. Попов

«14» сентября 2015 года

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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.

Диссертация М.М. Прибиль посвящена созданию электрохимических ферментных биосенсоров для определения лактата в различных диапазонах содержания, а также разработке неинвазивного монитора состояния гипоксии, позволяющего проводить непрерывное определение лактата в поте.

Электрохимические сенсоры и биосенсоры как нельзя лучше удовлетворяют требованиям современного анализа. Они просты и удобны в применении, не требуют пробоподготовки, а также обладают высокой чувствительностью и селективностью. Одним из наиболее важных аналитов в клинической диагностике и спортивной медицине является лактат. Его непрерывный мониторинг в крови необходим как для спортсменов во время

напряженных физических нагрузок, так и для пациентов в процессе интенсивной клинической терапии. В настоящей работе в процессе создания высокоэффективных лактатных биосенсоров впервые предложено адаптировать сканирующую электрохимическую микроскопию с целью скрининга ферментсодержащих мембран, что позволяет существенно уменьшить трудоемкость поиска условий иммобилизации лактатоксидазы на поверхность планарного электрода, модифицированного берлинской лазурью.

При интенсивных спортивных нагрузках уровень лактата в крови человека может повышаться в 10 раз, при этом динамика роста концентрации аналита позволяет определять наиболее перспективных спортсменов в различных видах спорта на выносливость, классифицировать режимы интенсивности беговых или иных нагрузок и, как следствие, повысить возможности реализации функциональных и тренировочных потенциалов. В настоящее время всё большее внимание уделяется неинвазивным методам исследования, кроме того, ранее была выявлена корреляция увеличения концентрации лактата в крови и в поте, что представляет возможным сменить объект исследования с крови на пот. В настоящей работе путем значительного понижения сродства фермента к субстрату диапазон определяемых концентраций лактата с использованием биосенсора пролонгирован в область высоких значений, что позволило определять физиологические содержания аналита в поте. На основе созданного биосенсора на высокие содержания лактата разработан неинвазивный монитор для контролирования состояния гипоксии.

Таким образом, работа М.М. Прибиль, посвященная созданию высокоэффективных лактатных биосенсоров на основе инженерии лактатоксидазы для возможности определения лактата в различных диапазонах содержания, в частности при разработке неинвазивного монитора

состояния гипоксии, является **актуальной, научно и практически значимой.**

Задачи, поставленные в работе М.М. Прибиль, включая адаптацию метода сканирующей электрохимической микроскопии для определения профиля концентрации пероксида водорода; нахождение оптимального содержания  $\gamma$ -аминопропилсилоксана в смеси при иммобилизации фермента для создания высокочувствительного и высокостабильного лактатного биосенсора; использование перфторсульфонируемого полимера для иммобилизации лактатоксидазы с целью понижения сродства фермента к субстрату; нахождение оптимального состава смеси для иммобилизации фермента с целью создания биосенсора на высокие содержания лактата; интеграцию полученного биосенсора на высокие концентрации лактата в неинвазивный монитор и апробацию разработанного устройства для непрерывного определения лактата в поте, отвечают заданной цели.

Комплексный подход к исследованию, включающий использование различных современных физико-химических методов, позволил автору выполнить работу не только имеющую фундаментальный характер, но и вносящую заметный вклад в развитие новых технологий, что также обосновывает **актуальность** диссертации.

Несомненна **научная новизна** работы, **наиболее существенными и новыми результатами** которой являются:

- использование сканирующей электрохимической микроскопии в качестве нового метода скрининга ферментсодержащих мембран различного состава для улучшения аналитических характеристик биосенсора для определения лактата;
- создание высокочувствительного и высокостабильного лактатного биосенсора на основе  $\gamma$ -аминопропилсилоксана в качестве мембранообразующего соединения для лактатоксидазы;

- предложение способа понижения аффинности лактатоксидазы к лактату, основанного на экранировании субстрат-связывающего участка отрицательно заряженным перфторсульфонируемым полимером при иммобилизации фермента на поверхности электрода, для расширения диапазона определяемых концентраций лактата в область высоких значений;
- создание биосенсора для определения высоких (миллимолярных) концентраций лактата с использованием  $\gamma$ -аминопропилсилоксана и перфторсульфонируемого полимера для иммобилизации фермента;
- разработка неинвазивного монитора состояния гипоксии на основе непрерывного определения лактата в поте.

**Практическая значимость** диссертации М.М. Прибиль обоснована возможностью использования разработанных биосенсоров для определения лактата в биологических жидкостях, что представляет интерес для спортивной медицины и клинической диагностики, а также применимостью созданного монитора состояния гипоксии для определения аналита в поте, что открывает обширные перспективы развития неинвазивной диагностики.

Кроме этого в результате исследований разработан высокостабильный микроэлектрод для определения пероксида водорода, который впервые использовался в качестве зонда для сканирующего электрохимического микроскопа. Коэффициент чувствительности микроэлектрода, модифицированного берлинской лазурью, составил  $1.6 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ , линейный диапазон определяемых концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$  от  $1 \cdot 10^{-5}$  до  $1 \cdot 10^{-2}$  М; показана высокая операционная стабильность.

Разработанный лактатный биосенсор на основе  $\gamma$ -аминопропилсилоксана характеризуется высокой чувствительностью  $0.33 \cdot \text{A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ , широким диапазоном определяемых концентраций лактата  $1 \cdot 10^{-6}$  -  $5 \cdot 10^{-3}$  М, а также длительной операционной стабильностью и

стабильностью при хранении, что немаловажно для коммерческого применения разработанного сенсора.

Созданный лактатный биосенсор на основе смешанных мембран из  $\gamma$ -аминопропилсилоксана и перфторсульфонируемого иономера позволяет проводить определение лактата в неразбавленном поте. Биосенсор характеризуется диапазоном определяемых концентраций почти 5 порядков в системе ПИА и длительной операционной стабильностью. Первые 3 ч измерений биосенсор стабильно работает и сохраняет первоначальное значение отклика, при хранении датчик не теряет чувствительности в течение, по крайней мере, 3 мес.

Разработанный лабораторный образец неинвазивного монитора состояния гипоксии применим для непрерывного определения лактата в секрете потовых желез непосредственно с поверхности кожи в состоянии покоя и в процессе физической нагрузки. Достоверность полученных данных подтверждена с помощью альтернативного метода, коэффициент корреляции составил 0.9930.

Диссертация имеет традиционную структуру и состоит из введения, девяти глав, в том числе обзора литературы (главы 1-5), описания экспериментальных методов исследования (глава 6), представления основных результатов и их обсуждения (главы 7-9), выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 163 страницах. Библиографический список содержит 207 ссылок на литературу.

Следует отметить выполненный автором обзор литературы, включающий большое число современных публикаций, описывающих различные методы определения лактата и современные подходы к иммобилизации ферментов при создании биосенсоров. Это подтверждает аргументированность и обоснованность поставленных проблем и задач работы в свете актуальности создания неинвазивных методов определения

лактата в спортивной медицине и клинической диагностике.

Стоит подчеркнуть попытки автора найти практическое приложение полученным результатам. Для разработанных биосенсоров показана возможность их применения для определения лактата в отобранных образцах пота. С помощью разработанного неинвазивного монитора проводили непрерывное определение аналита в поте у добровольцев в состоянии покоя и в процессе физической нагрузки. По результатам проведенных исследований сделан вывод о значительном повышении содержания лактата в поте при интенсивной физической нагрузке. Показана высокая корреляция результатов, полученных при помощи неинвазивного монитора и с использованием альтернативного метода с разбавлением образца.

Резюмируя все вышеприведенное, можно заключить, что полученные в диссертации М.М. Прибиль результаты обладают всеми признаками научной новизны, имеют существенное прикладное значение, основные выводы и заключения диссертанта обоснованы, их достоверность подтверждена экспериментами.

**Основные замечания** включают:

- 1) В работе исследована операционная стабильность биосенсоров, а также стабильность при хранении в холодильной камере. Стабильность биосенсора при длительном хранении имеет большое значение для коммерческого применения разработанных аналитических устройств, при тестировании биосенсора с силоксановой мембраной приведено, что спустя 18 месяцев хранения лактатный датчик сохраняет 80% от исходного значения чувствительности, однако не указано в течение какого времени хранения не наблюдается какой-либо потери отклика.
- 2) В тексте диссертации Таблица 8, начинающаяся на стр. 125, при продолжении на стр. 126 - 127 указывается как Таблица 7.

3) Известно, что состав пота и pH потовой жидкости варьируется в зависимости от участка кожи, с которого собирали образец. В работе не изучено влияние солевого состава и pH среды на отклик биосенсора для определения лактата. Для дальнейшего развития методов неинвазивного мониторинга лактата и создания прототипа неинвазивного монитора будет необходимо принять во внимание данный вопрос.

Отмеченные замечания не ставят под сомнение достоверность и обоснованность выводов и основных положений диссертации и не отражаются на ее оценке.

Диссертационная работа М.М. Прибиль имеет междисциплинарный характер и представляет интерес для специалистов из различных областей химической науки. Результаты диссертационной работы М.М. Прибиль можно рекомендовать к ознакомлению и использованию на Химическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, в Учреждении Российской Академии наук Центре «Фундаментальные основы биотехнологии», в Санкт-Петербургском государственном университете, Казанском федеральном университете, а также в других заинтересованных научных и учебных организациях.

Основные результаты диссертации опубликованы в 3 статьях в высокорейтинговых журналах, индексируемых в системе Web of Science, таких как Analytical Chemistry (импакт фактор 5.636), Journal of Electroanalytical Chemistry (импакт фактор 2.729) и ChemElectroChem. Стоит обратить внимание, что журнал Analytical Chemistry является в настоящее время наиболее престижным изданием по искомой специальности. Автореферат полно отражает содержание диссертации. Диссертация соответствует паспорту специальности 02.00.02 – Аналитическая химия в п. 2 – Методы химического анализа (химические, физико-химические, атомная и молекулярная

спектроскопия, хроматография, рентгеновская спектроскопия, масс-спектрометрия, ядерно-физические методы и др) и п. 16 – Клинический анализ.

Таким образом, диссертация М.М. Прибиль представляет собой законченную научно-квалификационную работу. Учитывая актуальность, достоверность и новизну основных результатов, их научную и практическую значимость, а также значительный объем выполненных автором исследований, считаем, что диссертация «Высокоэффективные лактатные биосенсоры на основе инженерии иммобилизованной лактатоксидазы» удовлетворяет изложенным в п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (в ред. Постановления Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842) требованиям, предъявляемым ВАК Российской Федерации к кандидатским диссертациям, а ее автор, Прибиль Медея Михайловна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Настоящий отзыв заслушан и одобрен на заседании лабораторий химической энзимологии и иммунобиохимии 10 сентября 2015 года (протокол № 2 от 10 сентября 2015 г.).

Зав. лабораторией химической энзимологии  
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,  
профессор, д.х.н.

Ярополов Александр Иванович

119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2

Тел.: 8 (495) 954-44-77

E-mail: [yaropolov@inbi.ras.ru](mailto:yaropolov@inbi.ras.ru)

[www.inbi.ras.ru](http://www.inbi.ras.ru)



14 сентября 2015 года