

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Алсовэйди Али Кадхим Мохаммед на тему «Микробные сенсорные системы для определения антибиотиков в водных растворах», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология

Актуальность работы. В настоящее время в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности широко применяются антибиотики, в связи с чем стоит проблема их контроля в природных водах, сточных водах фармацевтических предприятий и производств агропромышленного комплекса, в продуктах питания. Разработаны различные способы количественного определения антибиотиков, как правило, с применением дорогостоящего оборудования и необходимостью предварительной пробоподготовки. Для экспресс-анализа антибиотиков перспективными являются биосенсорные системы, которые состоят из чувствительного биологического элемента и системы детекции, позволяющей регистрировать биологический отклик на присутствие в образце аналита. Усилия ученых в области биосенсорики сосредоточены, во-первых, на поиске стабильных, высокочувствительных, селективных биологических объектов (клеток, ферментов, рецепторных белков, ДНК и др.), во-вторых, на разработке физико-химических методов, позволяющих уловить биологический отклик, и их приборное воплощение, и в-третьих, на способах совмещения биологического элемента с физическим датчиком – иммобилизации.

Среди сенсорных систем можно выделить микробные акустические сенсоры, принцип действия которых основан на регистрации биоспецифических реакций в жидкой суспензии, контактирующей с поверхностью пьезоэлектрического звукопровода, по которому распространяется пьезоактивная акустическая волна. Их преимуществом

является использование дешевого биологического компонента – бактерий и возможность проведения анализа в жидкости без предварительной иммобилизации клеток. В литературе практически нет сведений о применении акустических датчиков для определения антибиотиков. Таким образом, тема диссертационной работы Алсовэйди Али Кадхим Мохаммед «Микробные сенсорные системы для определения антибиотиков в водных растворах», является новой и актуальной для биотехнологии, а полученные результаты могут иметь не только теоретическое, но и практическое значение.

Научная новизна работы. Автором предложен новый метод определения канамицина и хлорамфеникола в жидкости с помощью микробной биосенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем. Разработан новый подход для оценки чувствительности микробных клеток к антибиотикам на примере канамицина с помощью сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем. Впервые получены антиампициллиновые фаговые антитела и показана возможность их применения для определения ампициллина методом дот-иммуноанализа.

Практическая и теоретическая ценность работы.

Продемонстрирована возможность определения канамицина и хлорамфеникола в жидкости с помощью микробной сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем. Зарегистрировано изменение аналитического сигнала сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем при воздействии антибиотика на бактерии, что позволяет оценить восприимчивость бактерий к исследуемому антибиотику. На примере ампициллина отработана методика получения специфичных антител с использованием технологии фагового дисплея. Установлено, что антиампициллиновые фаговые антитела обладают специфичностью в отношении ампициллина и не взаимодействуют с тетрациклином,

канамицином, L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином, что позволяет их применять для определения ампициллина в многокомпонентных растворах методом дот-иммуноанализа с визуальным учетом результатов.

Структура диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Диссертация изложена на 106 страницах, включает 30 рисунков и 1 таблицу. Список литературы включает 155 источника, в том числе 145 зарубежных.

Во **введении** автором обоснована актуальность темы диссертационного исследования, четко сформулированы цель и задачи работы. Показана научная новизна и практическая значимость проведенных исследований, определены положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы изложен грамотно и лаконично, автором хорошо проработана проблема исследования. Сделан акцент на масштабе применения антибактериальных препаратов в здравоохранении и ветеринарии, возрастающий риск появления и распространения антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов, что диктует необходимость контроля содержания этих веществ в объектах окружающей среды и продуктах питания. Автором проанализированы физико-химические методы определения антибиотиков, выявлены их достоинства и недостатки. Определено, что существующие методы либо недостаточно чувствительны и селективны, требуют пробоподготовки, в том числе концентрирования пробы, либо отличаются применением дорогостоящего оборудования и реагентов. Далее автором проанализированы научные статьи последних лет по разработке и применению разнообразных видов биосенсоров для определения антибиотиков в жидких средах. Особое внимание уделено микробным сенсорным системам, поскольку микроорганизмы, проявляющие чувствительность к антибиотику, в комплексе с электрофизическим

датчиком, могут представлять простые, чувствительные и быстродействующие сенсоры.

Во второй главе описаны материалы и методы исследования. В работе использованы современные, высокотехнологичные методы исследования: электронно-микроскопический анализ, световая фазово-контрастная микроскопия, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, дот-иммуноанализ, твердофазный иммуноферментный анализ, а также уникальные приборы: пьезоэлектрический резонатор с поперечным электрическим полем и акустический анализатор на основе резонатора с поперечным электрическим полем.

В третьей главе приведены результаты собственных исследований автора по разработке микробного сенсора на антибиотики на основе акустического датчика. Первоначально автор исследовал отклик бактерий *Escherichia coli* B-878, обладающих чувствительностью к канамицину, на содержание данного антибиотика в водной среде с помощью датчика на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем. Были подобраны условия проведения анализа, получены частотные зависимости электрического импеданса для суспензии клеток после воздействия канамицина в концентрационном диапазоне 1.0 – 8.0 мкг/мл, оптимизировано время анализа – 10 мин. Установлено, что предел обнаружения канамицина в водной среде составляет 1 мкг/мл. Эффект воздействия канамицина на бактерии был подтвержден с помощью световой фазово-контрастной микроскопии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Тем самым автор доказал правомерность использования акустического сигнала в качестве отклика бактерий на антибиотик.

Далее автор заменил в эксперименте датчик на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем на компактный акустический анализатор, который можно применять в полевых условиях. И получил достоверно отличающийся от контроля сигнал на присутствие канамицина в пробе в концентрации 0.5 мкг/мл, а также

линейную зависимость сигнала в интервале концентраций антибиотика 0.5 – 2.5 мкг/мл. Это свидетельствует о возможности количественного определения канамицина. Аналогичные результаты были получены при использовании другого штамма *E. coli* K-12 и антибиотика хлорамфеникола. В данном случае была построена линейная концентрационная зависимость в диапазоне концентраций антибиотика 0.5 – 12 мкг/мл, проведены эксперименты по определению концентрации антибиотика с использованием калибровочной кривой, определена ошибка одного измерения концентрации антибиотика – $\pm 4\%$.

Особого внимания заслуживает эксперимент по оценке восприимчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Для этой цели соискатель использовал несколько штаммов *E. coli*, чувствительных и устойчивых к канамицину, и продемонстрировал, что клетки, устойчивые к антибиотику, не проявляют акустического сигнала, в отличие от бактерий, чувствительных к нему. Следовательно, данный метод можно использовать для скрининга антибиотиков, для определения спектра их антимикробной активности.

В четвертой главе диссертантом представлены результаты исследований, целью которых было получить антитела, специфичные к ампициллину, и применить их для определения ампициллина методом дот-иммуноанализа. Данный подход к разработке биосенсоров кардинально отличается от подхода, использованного в предыдущей главе. Важно, что автор начал главу с краткого литературного обзора, тем самым раскрыл степень разработанности проблемы. Соискатель освоил методику получения фаговых антител и адаптировал ее под задачи эксперимента. В результате им были впервые получены фаговые антитела, специфичные к β -лактамам антибиотикам, в частности, к ампициллину, что является несомненным достижением данной работы. С помощью дот-иммуноанализа было доказано, что антиампициллиновые фаговые антитела, обладают специфичностью к ампициллину, чувствительность определения антибиотика составляет 1

мкг/мл. Установлено, что полученные антитела не взаимодействуют с антибиотиками других классов и некоторыми аминокислотами, т.е. обладают определенной специфичностью. В дальнейшем антиампициллиновые фаговые антитела могут быть использованы в качестве чувствительного компонента при определении ампициллина в водных растворах.

Достоверность результатов исследований не вызывает сомнений, поскольку эксперименты проводились с применением современных высокоточных аттестованных приборов и полученные данные статистически обработаны. Исследования выполнялись при поддержке грантов РФФИ и РНФ, следовательно, под контролем данных фондов.

Работа лаконично и грамотно написана, хорошо иллюстрирована, автореферат диссертации полностью отражает основные положения диссертации.

Результаты работы были представлены на всероссийских и международных научных конференциях, основное содержание диссертационной работы достаточно полно отражено в 9 научных статьях, опубликованных в российских научных журналах из списка ВАК РФ и в 2 статьях в иностранных журналах.

При анализе диссертационной работы возникли **вопросы и замечания:**

1. Во введении сказано, что автором «по материалам исследования разработано и издано учебное пособие для студентов старших курсов по определению хлорамфеникола с помощью сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем». Но в списке работ автора, представленном в автореферате, данное пособие не фигурирует.
2. Объясните, почему сигналы двух использованных в работе датчиков на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем отличаются по форме (рис.9, 17). Расшифруйте, что такое $|Z|$ (рис.17) и чем эта величина отличается от R (рис. 9).

3. Объясните, почему компактный акустический анализатор оказался более чувствительным к канамицину, чем датчик на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем.
4. Почему антиампициллиновые фаговые антитела не были протестированы в качестве чувствительного компонента для определения других β -лактамных антибиотиков? Будут ли они проявлять аналогичную чувствительность к антибиотикам одной группы?
5. На с. 53 указано, что в экспериментах использовали канамицин в концентрациях: 1.0, 2.0, 4.0 и 8.0 мкг/мл. Результаты приведены на рис. 9. Но в подписи к рис. 9 приведены другие значения концентрации канамицина: 0.5, 1, 2, 4 мкг/мл. Где автор ошибся?
6. На с. 64 написано: «На рисунке 17 в качестве примера представлены частотные зависимости модуля электрического импеданса датчика для суспензии клеток до (синяя кривая) и после (красная кривая) воздействия канамицина...», а в подписи к рис. 17, наоборот указывается, что «оранжевая кривая – измерение до добавления канамицина; синяя кривая – измерение после добавления канамицина...».

Заключение. Сделанные замечания не снижают научную и практическую значимость работы. Необходимо отметить, что соискатель Алсовэйди Али Кадхим Мохаммед выполнил работу самостоятельно на высоком методическом уровне. Его диссертация является законченной научно-квалификационной работой, она отвечает требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Предложенные автором решения научно обоснованы, выводы соответствуют результатам экспериментов.

Считаю, что диссертационная работа Алсовэйди Али Кадхим Мохаммед на тему «Микробные сенсорные системы для определения антибиотиков в водных растворах» по своему объему, методическому уровню выполненных исследований, новизне, актуальности, теоретической и

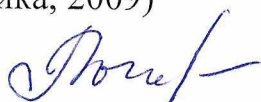
практической ценности полученных результатов соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук (пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней»), а ее автор, Алсовэйди Али Кадхим Мохаммед, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология.

Официальный оппонент:

заместитель руководителя по научной работе,
заведующий кафедрой естественно-научных дисциплин
Филиала частного учреждения образовательной организации
высшего образования «Медицинский университет «Реавиз» в городе Саратов
доктор биологических наук,

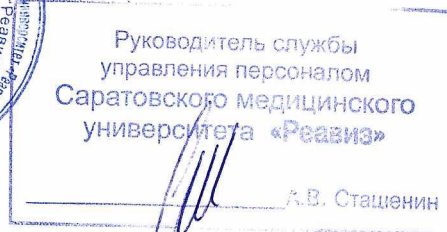
(03.00.02 – биофизика, 2009)

профессор



Рогачева Светлана Михайловна

Филиал частного учреждения образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз» в городе Саратов (Саратовский медицинский университет «Реавиз»), 410002, Саратовская область, г. Саратов, ул. Верхний рынок, 10, телефон: 88006002400, e-mail: saratov@reaviz.ru



18.03.2024.