

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора

ФГБУН Институт биохимии

и физиологии микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина РАН

д.б.н., проф.

М.Б. Вайнштейн

« 7 » ноября 2016 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института биохимии и физиологии микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук

на диссертационную работу Сафроновой Валентины Андреевны

«Экспресс - методы иммуноанализа прогестерона в молоке для целей ветеринарной
диагностики»,

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по
специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Работа Сафроновой В.А. посвящена разработке новых высокочувствительных экспресс-методов полуколичественного определения прогестерона в молоке для целей ветеринарной диагностики. Создание экспресс-методов анализа для количественного определения физиологически активных веществ в биологических жидкостях является одной из наиболее важных задач современной аналитической биотехнологии. Широкое распространение быстрые методы анализа получили в области медицинской диагностики, в анализе объектов окружающей среды, пищи, определения пестицидов, токсинов, наркотических веществ и др. Наиболее распространенным в экспресс-методах диагностики является латеральный проточный иммуноанализ (ЛПИА). Анализ позволяет получать результат по появлению окрашенной полосы или ее интенсивности в аналитической зоне мембраны. Несомненным достоинством такого рода систем является быстрота (анализ проводится в течение нескольких минут), наличие всех необходимых для проведения определения реагентов в самом устройстве – лаборанту следует только внести каплю анализируемого раствора на мембрану, возможность проведения анализа в «полевых» условиях, визуальная оценка результатов анализа без специального

оборудования, высокая чувствительность которая сравнима с характеристиками иммуноферментного анализа, стабильность при хранении, относительно низкая стоимость. Интенсивное развитие подобных методов в последнее десятилетие, широкое внедрение их в практику обусловлено совершенствованием технологической базы. Отработаны компоненты устройств латерального иммуноанализа, в том числе мембран, получивших действенные характеристики размера пор, скорости протока жидкости, сорбционные свойства и другие свойства специфических компонентов (антитела и др.). Кроме того, разработаны методики получения наночастиц коллоидного золота и их конъюгатов с белками, используемых в качестве визуальных меток образующихся специфических иммунокомплексов и т.д.

В области ветеринарии важной практической задачей является раннее выявление стельности коров после проведения искусственного осеменения, позволяющее хозяйствам получать значительный экономический эффект за счет снижения расходов на содержание яловых животных. Перспективными подходами определения стельности являются иммунохимические методы анализа прогестерона в молоке коров, позволяющие проводить неинвазивную диагностику животных уже на 19-21 день после осеменения, а также на ранних стадиях выявлять заболевания органов репродуктивной системы животных. В настоящее время большинство используемых в практической ветеринарной диагностике работ ограничивается лишь разработкой стандартных микропланшетных методов ИФА прогестерона в молоке. Однако, разработка традиционных микропланшетных методов ИФА прогестерона является лишь необходимым начальным этапом работ, продолжение которых подразумевает сокращение времени анализа и упрощение процедуры его проведения. В этой связи создание быстрых методов анализа прогестерона в молоке, не требующих использования дорогостоящего лабораторного оборудования и позволяющих проводить анализ на месте отбора образцов, является актуальной практической задачей. Решению именно этой практической задачи и посвящена диссертационная работа. При ее выполнении необходимо было разработать не просто лабораторный экспресс-метод анализа прогестерона в молоке, а разработать устройство, позволяющее по появлению окрашенной зоны в аналитической части сделать однозначный вывод о количественном содержании гормона. Должна быть тест-реакция в строго необходимой физиологической области концентраций прогестерона с возможностью чисто визуальной оценки результатов анализа по принципу "да-нет" без использования каких-либо инструментальных средств в полевых условиях.

Автором было предложено два подхода для создания таких экспресс-методов – по принципу латерального проточного иммуноанализа и по принципу

иммунофилтратационного анализа. В работе было показано, что использование традиционной в обоих методах метки из наночастиц коллоидного золота не позволяет достигнуть требуемого для решения конечной задачи рабочего диапазона определяемых концентраций гормона в молоке. Такой результат является характерным при анализе многих низкомолекулярных веществ в виду необходимости использования конкурентной схемы иммуноанализа и достаточно больших концентраций меченного наночастицами золота антител для получения видимой глазом окраски тестовой зоны. Основываясь на результатах проведенного теоретического рассмотрения конкурентных методов иммуноанализа, в обеих схемах было предложено, для повышения чувствительности определения меченого реагента и достижения тем самым более низких пределов обнаружения анализируемого вещества, использовать в качестве метки фермент пероксидазу хрена, концентрацию которого как метки можно определять в низком диапазоне. Предложенный метод проточного латерального иммуноанализа с использованием реагентов, меченных ферментом, был назван автором латеральным проточным иммуноферментным анализом (ЛПИФА). Конечным итогом в обоих случаях явилась разработка простых количественных методов проведения экспресс-анализа прогестерона в молоке в необходимых физиологических диапазонах концентраций, позволяющих на основе визуальной оценки результатов анализа выявлять стельность коров на ранних стадиях. Таким образом тематика выполненной работы является *актуальной* как с научной, так и с практической точки зрения, а полученные результаты работы представляют собой *большую практическую ценность* для молочно-животноводческих хозяйств.

Диссертационная работа Сафроновой В.А. изложена на 139 страницах и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (глава 2), описывающей материалы и методы исследования, результатов и их обсуждения (глава 3), выводов и списка цитируемой литературы, который включает 201 ссылку. Работа содержит 12 таблиц и 67 рисунков.

Первая часть литературного обзора описывает известные и наиболее широко применяемые при определении биологически важных веществ экспресс-методы иммуноанализа на основе методов ЛПИА и иммунофилтрации. В разделе, посвященном методу ЛПИА, подробно охарактеризованы компоненты, входящие в состав тест-полосок для проведения анализа: состав полимерных мембран и возможности модификации мембраны с целью повышения чувствительности анализа, рассмотрены теоретические закономерности физико-химических процессов, происходящих в порах мембраны в процессе протекания иммунохимических реакций. Также описаны свойства и применение

наиболее часто используемых основных меток, применяемых в ЛПИИ, таких как коллоидное золото, квантовые точки, флуоресцентные метки и т.д. Материал изложен подробно и дает представление о методе и возможностях его использования. В разделе про иммунофилтрационный метод анализа (ИФиА) описываются основные принципы работы тест-систем, а также обсуждается многообразие методик проведения анализа. Отмечено большое количество работ, посвященных определению низкомолекулярных веществ методом иммунофилтрационного анализа. Особое внимание Сафронова В.А. акцентирует на том, что для разработки иммунофилтрационных методов анализа достаточно распространенной меткой является ферментная метка, в отличие от метода ЛПИИ, где в основном используют наночастицы коллоидного золота.

Вторая часть литературного обзора посвящена выбранному объекту исследования - низкомолекулярному гормону прогестерону, его физико-химическим свойствам, физиологической роли в организме коров. Проведен обзор достаточно большого числа работ, посвященных определению гормона прогестерона с целью выявления стельности: иммунохимическим методам анализа (РИА, ИФА и др.), а также существующим в настоящее время быстрым методам определения, что также указывает на актуальность и значимость для практики темы настоящей работы. Сафронова В.А. также анализирует работы, в которых были предприняты попытки по созданию экспресс-методов определения прогестерона на основе принципа ЛПИИ.

Таким образом, обзор литературы отражает основные тенденции в исследованиях, посвященных быстрым методам ЛПИИ и ИФиА, а также показывает необходимость создания быстрых методов для определения гормона прогестерона и **новизну** данной тематики.

В главе "Экспериментальная часть" описаны основные реагенты, использованные в работе, методики получения конъюгатов прогестерона меченного золотыми наночастицами и ферментом - пероксидазой хрена, схемы проведения анализа методами ЛПИИ и ИФиА.

Глава "Результаты и обсуждение" содержит два больших раздела, посвященных созданию тест-систем для определения прогестерона в цельном молоке коров на основе быстрых методов ЛПИИ и ИФиА. Сафронова В.А. акцентирует внимание на том, что в данном случае необходимо не просто разработать экспресс-метод определения прогестерона, а для целей ветеринарной диагностики требуется определять уровень гормона в физиологическом диапазоне концентраций <7-10 нг/мл. Разработку экспресс-метода Сафронова В.А. начинает с рассмотрения метода ЛПИИ с применением в качестве метки наиболее широко используемых частиц коллоидного золота. Было установлено, что

с использованием данного типа метки, прогестерон, можно определять в концентрациях значительно превышающих уровень 10 нг/мл, что не соответствует поставленной перед диссертантом задаче. Были предприняты различные попытки снижения предела обнаружения: рассмотрены конъюгаты прогестерона с наночастицами золота меньшего размера, применена схема с использованием белка А в тестовой зоне и предложена возможность использования в качестве метки фермента – пероксидазы хрена. Последнее предположение позволило снизить предел обнаружения на порядок по сравнению с использованием метки коллоидного золота. На этом принципе после проведения необходимой оптимизации был предложен и успешно разработан новый метод латерального проточного иммуноферментного анализа для определения прогестерона в цельном молоке коров в физиологическом диапазоне концентраций, необходимом для ветеринарной диагностики. Следует отметить, что разработанная методика обладает рядом достоинств. К ним относятся быстрота - время проведения анализа 15-20 минут, возможность определения гормона в цельном молоке без пробоподготовки, а также количественная оценка содержания гормона с использованием инструментальных методов (отражательный ридер или сканер) в диапазоне концентраций 2 - 40 нг/мл, что подтверждено сравнением результатов с высокочувствительным количественным методом ИФА. Результаты работ по раннему выявлению стельности коров, полученные разработанным методом анализа прогестерона в молоке на реальных молочных хозяйствах, были сопоставлены с независимыми данными ректального исследования, что позволило оценить такие характеристики метода как специфичность и чувствительность. Основным недостатком разработанной методики Сафронова В.А. считает возможность точной безинструментальной визуальной оценки результата только при концентрациях прогестерона менее 3 нг/мл и более 30 нг/мл. Данная особенность не позволяет применять данный экспресс-метод во внелабораторных условиях для оценки стельности коров по принципу «да-нет». К минусам отнесено наличие дополнительной стадии окрашивания тест-полоски субстратом для получения визуального результата, что несколько усложняет процедуру проведения анализа. Таким образом, логически был выполнен переход к следующей главе, посвященной созданию иммунофилтрационного метода анализа для определения прогестерона. Разработанный метод ИФиА с ферментной меткой в результате является более чувствительным методом по сравнению с методом ЛПИА. В данном случае в области концентраций 7-10 нг/мл окраска тестовой зоны полностью исчезает, что позволяет применять разработанную методику для ветеринарной диагностики по принципу "да-нет". Процедура проведения экспресс-метода ИФиА проста, время проведения анализа составило 10-15 минут. Для проведения анализа в цельном

молоке коров, при данном виде анализа, требуется лишь небольшое разведение образца. Диссертантом было проведено сравнение разработанных экспресс-методов с высокочувствительным методом ИФА. Было показано, что данные хорошо коррелируют друг с другом.

Выводы, сделанные по итогам проделанной работы, являются обоснованными и соответствуют полученным результатам. Диссертантом проделан большой объем работы с использованием современных биотехнологических методов исследования. Результаты работы были представлены на одиннадцати российских и международных конференциях и конгрессах, отражены в публикациях, в том числе 2 в изданиях, индексируемых в базах данных «Web of Science» и «Scopus» и входящих в перечень журналов ВАК.

По выполненной работе можно сделать следующее **замечание**: поскольку результаты по разработке визуального внелабораторного иммунофилтрационного метода анализа прогестерона в молоке имеют ярко выраженную практическую направленность, желательно провести его апробацию на материале конкретного молочного хозяйства. Сопоставить полученные данные с результатами используемого в настоящее время в качестве стандарта ректального метода исследования. Подобная работа (успешно проведенная автором для ЛПИФА) позволила бы получить достоверные данные и подтвердить возможность практического использования разработанного метода для проведения внелабораторного экспресс-анализа прогестерона в молоке с целью раннего выявления стельности. Данное замечание не изменяет обоснованность положений, выносимых на защиту, и не снижает общую положительную оценку работы.

Полученные автором результаты работы могут быть использованы не только в конкретных молочных хозяйствах агропромышленного комплекса РФ, но и ввиду важности методических и теоретических разработок принципов проведения экспресс-методов анализа, представляют интерес для лабораторий, работающих в области биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии научных и образовательных центров. Автореферат диссертации адекватно отражает результаты диссертации.

Диссертация Сафроновой Валентины Андреевны является завершенной и оригинальной научно-исследовательской работой высокого теоретического и экспериментального уровня. По своей актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований и практической значимости полученных результатов диссертационная работа «Экспресс-методы иммуноанализа прогестерона в молоке для целей ветеринарной диагностики» соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на

соискание учёной степени кандидата наук, а ее автор достойна присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Результаты исследований Сафроновой В.А. были представлены и одобрены на заседании Лаборатории биосенсоров Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (протокол № 11 от 2 ноября 2016г)

Заведующий Лаборатории биосенсоров
профессор, доктор химических наук

Решетиллов А. Н.

ФГБУН «Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук»
142290 Московская область, г. Пущино,
пр-т Науки, д.5, Тел./факс: (495)956-33-70.
e-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru



Решетиллова А.Н.
Зав. канцелярией
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

По диссертационной работе Сафроновой Валентины Андреевны «Экспресс-методы иммуноанализа прогестерона в молоке для целей ветеринарной диагностики», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Полное и сокращенное название ведущей организации	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН)
Почтовый адрес	142290, Московская обл., г. Пушкино, проспект Науки, д. 5
Адрес официального сайта в сети «Интернет»	http://ibpm.ru/
Телефон	+7 (495) 956-33-70
Адрес электронной почты	rta@ibpm.pushchino.ru
Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание руководителя ведущей организации и лица, утвердившего отзыв ведущей организации	Вайнштейн Михаил Борисович, Доктор биологических наук, профессор, заместитель директора ФГБУН Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук
Фамилия, имя, отчество, лица, составившего отзыв ведущей организации, ученая степень, отрасль науки, научные специальности, по которым им защищена диссертация, ученое звание, должность и полное наименование организации, являющейся основным местом его работы	Решетиллов Анатолий Николаевич, Доктор химических наук по специальности биотехнология – 03.01.06, профессор, заведующий лабораторией биосенсоров, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН)
Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	<ol style="list-style-type: none"> Arlyapov V., Kamanin S., Ponamoreva O., Reshetilov A. Biosensor analyzer for BOD index express control on the basis of the yeast microorganisms <i>Candida maltosa</i>, <i>Candida blankii</i>, and <i>Debaryomyces hansenii</i> // Enzyme and Microbial Technology. 2012. № 50. P. 215-220. doi: 10.1016/j.enzmictec. 2012.01. Reshetilov A. N, Kitova A. E., Arkhipova A. V, Kratasyuk V. A., Mahendra K. Rai. Determination of ethanol in acetic acid-containing samples by a biosensor based on immobilized <i>Gluconobacter</i> cells // Nusantara Bioscience. (Isea Journal of biological sciences) 2012. V. 4. N. 3. P. 97-100. Arlyapov V.V., Yudina N. Yu, Asulyan L.D., Alferov S.V., Reshetilov A.N. BOD biosensor based on the yeast <i>Debaryomyces hansenii</i> immobilized in poly (vinyl alcohol) mod-

ified by N-vinylpyrrolidone // Enzyme and Microbial Technology. 2013. V. 53. P. 257-262.

4. Кашин В.В., Колесов В.В., Крупенин С.В., Паршинцев А.А., Решетилов А.Н., Солдатов Е.С., Азев В.Н. Молекулярный нанобиосенсор на основе фермента глюкозооксидазы // Радиоэлектроника. Наносистемы. Информационные технологии Изд-во: Издательский центр Российской академии естественных наук. Москва. 2013. Т. 5. № 2. С.45 – 59.

5. Каманин С.С, Арляпов В.А., Мачулин А.В., Алферов В.А., Решетилов А.Н Биосенсоры на основе модифицированных ферментных печатных электродов для контроля бродильных процессов // Прикладная химия. 2015. Т 88. № 3. С. 458-467.

6. Reshetilov A. N, Kitova A. E, Kolesov V.V., A.I. Yaropolov A.I. Mediator-free bioelectrocatalytic oxidation of ethanol on an electrode from thermally expanded graphite modified by *Gluconobacter oxydans* membrane fractions // Electroanalysis. 2015. V. 27. № 6. P. 1443–1448.

Публикации утвердившего отзыв Вайнштейна Михаила Борисовича, заместителя директора, д.б.н., профессора

7. Vainshtein M., Abashina T., Bykov A., Repina A., Kaparullina E. Formate supplementation can increase nickel recovery by halothio-bacillus halophilus. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2015. T. 31. № 3. С. 535-537.

8. Vainshtein M. Probiotics for environmental sanitation: goals and examples. In “Current Environmental Issues and Challenges”: p 127-135. Cao, G., Orru, R. (Eds.. Springer, 2014. VIII, 278 p.

«Верно»

Заместитель директора

доктор биологических наук (специальность – микробиология),

профессор (микробиология и биотехнология)

«7» ноября 2016 г.

М.Б. Вайнштейн

