

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки

«Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»

(ФИЦ ПНЦБИ РАН)

142290, г. Пушкино Московской обл.,

проспект Науки, д.3.

Тел./факс: (4967)73-26-36,

e-mail: info@pncbi.ru, <https://www.pncbi.ru>


ОКПО 02699688, ОГРН 1025007768983, ИНН/КПП
5039002841/503901001



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФИЦ ПНЦБИ РАН

д.ф.-м.н. Грабарник Г.Я.


«21» марта 2024 г.

21.03.2024 № 191-01-2115/216

На № _____ от _____

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» на диссертационную работу Алсовэиди Али Кадхим Мохаммед на тему: «Микробные сенсорные системы для определения антибиотиков в водных растворах», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ. Проблема безопасности применения антибактериальных препаратов стала актуальной, как в национальном, так и в международном масштабе. Несоблюдение ветеринарных требований по применению антибактериальных препаратов приводит к их накоплению в продуктах животного происхождения. Все это вызывает различные негативные последствия для здоровья людей, животных, а также окружающей среды. Ряд авторов сходятся во мнении, что поступление в организм человека антибиотиков с пищевыми продуктами крайне нежелательно, поскольку они могут оказывать токсическое действие, приводить к возникновению аллергических реакций, дисбактериозов, циркуляции резистентных штаммов, образованию L-форм бактерий,

влияющих на бактериальную флору, нарушению обмена веществ и другим негативным последствиям. В этой связи актуальной является разработка ускоренных методов исследования для контроля антибактериальных веществ, особенно, в водных ресурсах.

Успешными для анализа антибиотиков являются биосенсорные методы, основой которых является биологический обнаруживающий элемент (биорецептор), интегрированный с физическим преобразователем. Одним из основных моментов при конструировании биосенсоров является подбор чувствительного (сенсорного) элемента датчика. Микроорганизмы, проявляющие чувствительность к определяемому антибиотику, в комплексе с датчиком являются одной из основ сенсорных систем. Особо выделяются акустические биосенсоры, чувствительным элементом которых являются бактерии. Такие датчики способны проводить определение антибиотиков непосредственно в жидкости без предварительной иммобилизации анализируемых компонентов. Методы электроакустического анализа биологических жидкостей и суспензий активно развиваются в последние два десятилетия, свидетельством чего является усовершенствование известных методов и появление новых подходов. Поэтому актуальным является развитие методов определения антибиотиков на основе акустических сенсорных систем.

В качестве биоселективного компонента (элемента распознавания) сенсорной системы могут быть использованы антитела, специфичные к определяемому антигену. При разработке диагностических методов исследователи стремятся к получению высокоспецифичных и высокоактивных антител с высокой аффинностью. Альтернативным способом получения специфичных антител является технология фагового дисплея, в основе которой лежит экспонирование чужеродных пептидов или белков на поверхности фаговых частиц в составе одного из химерных белков оболочки. Успех в применении фаговых антител в качестве сенсорного элемента датчика в значительной степени зависит от предварительной отработки метода их наработки и тестирования. Поэтому разработка методики получения антител, специфичных к антибиотикам с использованием технологии фагового дисплея, а также оценка возможности их применения для определения антибиотиков являются актуальными в современной биологии.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЙ И РЕЗУЛЬТАТОВ. Новизна результатов диссертационного исследования заключается в том, что предложен новый метод определения канамицина и хлорамфеникола в жидкости с помощью биосенсорной тест-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.

ОБЪЕМ И 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 из них зарубежных.

Во введении обоснована актуальность темы исследования и показана степень проработки проблемы; сформулированы цель и задачи исследования; научная новизна, практическая и теоретическая значимость полученных результатов исследования; их достоверность; основные положения диссертации, выносимые на защиту; представлены методология и методы исследования; апробация результатов исследования и личный вклад соискателя; представлены результаты публикаций материалов диссертационного исследования в различных научных изданиях, в том числе входящих в списки Scopus/WebofSciences и в перечень ВАК РФ; представлена структура и объем диссертации.

В обзоре литературы представлен критический анализ научных публикаций по теме исследования, а также краткая информация о масштабах применения антибактериальных препаратов в мире, важности развития методов их определения; основных методах определения антибиотиков, в том числе, с помощью биосенсорных систем.

В методической части работы – глава 2 **Материалы и методы исследований** представлены объекты и методы, используемые в работе; подробно описаны сенсорные системы, задействованные в исследовании. Достаточно подробно изложена методика фагового дисплея. Представлено описание подготовки образцов для микроскопирования.

Результаты собственных исследований и их обсуждение, представленные в следующих 2х главах (глава 3 и 4), основаны на большом фактическом материале и отвечают требованиям новизны, теоретической и практической значимости.

В третьей главе представлены результаты по развитию микробной сенсорной системы на основе акустических датчиков для определения антибиотиков (канамицина и хлорамфеникола). Установлена корреляция экспериментальных данных, полученных с помощью акустического датчика с результатами, полученными с помощью световой фазово-контрастной микроскопии и стандартного микробиологического анализа. Представленный способ демонстрирует стабильность, воспроизводимость и повторяемость результатов.

В этой же главе описывается новый подход для оценки чувствительности микробных клеток к антибиотикам на примере канамицина с помощью сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем с диапазоном рабочих частот 6 – 7 МГц.

В четвертой главе описана перспективность получения антител, специфичных к антибиотикам, с применением овечьей дисплейной библиотеки фрагментов scFv (Griffin.1, UK) на примере ампициллина. В качестве тест-системы для определения антибиотиков предложен метод дот-иммуноанализа с использованием вторичного биоспецифического мечения (ампициллин/фаговые антитела/конъюгаты кроличьих антифаговых антител с различными метками). Установлено, что полученные фаговые антитела обладают специфичностью в отношении ампициллина и не взаимодействуют с другими антибиотиками тетрациклином и канамицином, а также с близкими по химической формуле с ампициллином веществами – L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином.

В своем **Заключении** диссертант подвел итоги экспериментального исследования и сформулировал выводы.

СТЕПЕНЬ ОБОСНОВАННОСТИ И ДОСТОВЕРНОСТИ ВЫВОДОВ И РЕЗУЛЬТАТОВ И ЛИЧНЫЙ ВКЛАД СОИСКАТЕЛЯ.

Представленная диссертация является завершенной научно-квалификационной работой. Современный методический уровень исследований, широкий диапазон исследуемых материалов, логическая последовательность и четкость изложения материала свидетельствует об обоснованности и достоверности полученных автором результатов и положений, выносимых на защиту. Несомненным достоинством диссертации является хороший литературный и научный стиль изложения, качественно выполненный иллюстративный материал. Выводы вытекают из результатов экспериментальных исследований, научно обоснованы.

Личный вклад соискателя. Диссертант принимал непосредственное участие в планировании, подготовке и проведении экспериментальных исследований, анализе полученных результатов и их интерпретации, формулировке выводов, подготовке публикаций. Отдельные эксперименты или их этапы проводились совместно с коллегами из Саратовского филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова (г. Саратов) и ИБФРМ РАН (г. Саратов).

Таким образом, достоверность, обоснованность полученных результатов и личный вклад в исследования соискателя не вызывает сомнений.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. Основные положения диссертации и материалы проведенных исследований были представлены на 2-й и 3-й международной научной конференции PLAMIC2020 и PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Саратов, 2020;

Санкт-Петербург, 2022), II и III Международной научной конференции «Исследования молодых учёных в биологии и экологии» (Саратов, 2021, 2022), национальной научно-практической конференции «Зыкинские чтения», посвященной памяти д.м.н., проф. Зыкина Л.Ф. (Саратов, 2021, 2022, 2023).

Работа выполнялась в лаборатории биохимии ИБФРМ РАН в соответствии с плановыми темами НИР «Выявление структурно-функциональных особенностей биополимеров и надмолекулярных комплексов ризосферных бактерий, детерминирующих образование ассоциативного симбиоза как формы адаптации к условиям обитания» (2019-2023 гг.), номер государственной регистрации № 121032300311-5.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ 19-07-00304 «Разработка новых принципов создания акустических биологических анализаторов нового поколения для быстрого определения концентрации и жизнеспособности бактериальных клеток в жидкой фазе для биосенсорных информационных систем» (2019-2021);

РНФ № 22-29-00587 «Акустические микробные сенсорные системы для определения антибиотиков в проводящих растворах» (2022-2023 гг.), РНФ № 22-24-00417 «Разработка оптической тест-системы для анализа антибиотиков» (2022-2023 гг.).

ПОЛНОТА ПУБЛИКАЦИИ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ В НАУЧНОЙ ПЕЧАТИ. Обзор литературных данных, полученные соискателем результаты экспериментальных исследований опубликованы в 19 работах, в том числе в 11 статьях в научных изданиях, индексируемых международными базами данных, перечень которых определен в соответствии с рекомендациями ВАК РФ.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ. Полученные соискателем результаты и сделанные на их основании выводы могут быть реализованы для определения антибактериальных препаратов в водных растворах. Антиампициллиновые фаговые антитела могут быть использованы для детекции ампициллина в водных растворах методом дот-иммуноанализа.

В перспективе исследования будут направлены на апробацию и оптимизацию методов определения антибиотиков с помощью разработанных сенсорных систем на других группах антибиотиков, а также в условиях, приближенных к реальным образцам и в реальных образцах.

Антиампициллиновые антитела, полученные с помощью технологии фагового дисплея, потенциально могут быть использованы в качестве чувствительного (распознающего) компонента определения ампициллина в водных растворах. Отработанная технология может служить основой для наработки антител, специфичных к другим группам антибиотиков.

Рассматривая диссертационную работу в целом, можно констатировать, что тема соответствует заявленной научной специальности. Полученные экспериментальные результаты всесторонне проанализированы и профессионально изложены, соответствуют поставленным цели и задачам исследования. Экспериментальные данные математически обработаны с использованием современных статистических методов анализа. Содержание диссертации достаточно полно отражено в автореферате и опубликованных научных работах.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИИ И АВТОРЕФЕРАТУ.

- Литературный раздел по описанию масштабов применения антибактериальных препаратов в мире желательно было дополнить сводными таблицами и диаграммами, демонстрирующими важность проблематики.

- Раздел «Биосенсорные методы для определения антибиотиков» желательно дополнить обобщающими данными по сенсорным системам в виде таблицы.

- На с. 53 диссертации отмечено, что в экспериментах использовали канамицин в концентрациях: 1.0, 2.0, 4.0 и 8.0 мкг/мл, результаты анализа приведены на рис. 9, однако, в подписи к рис. 9 приведены другие значения концентрации используемого антибиотика: 0.5, 1, 2, 4 мкг/мл. Поясните, какие именно концентрации канамицина использовали в работе?

- Почему антиампициллиновые фаговые антитела не были протестированы в качестве чувствительного компонента для определения ампициллина с применением акустических датчиков? Будут ли они применяться для определения антибиотиков с помощью сенсорных систем?

- Практическая значимость диссертации не вызывает сомнений, поэтому возникает вопрос, почему не оформлен патент на отработанные методики?

- В работе встречаются стилистические ошибки и опечатки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ.

Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.6 – Биотехнология. Автореферат и научные публикации соответствуют содержанию диссертации. Высказанные замечания не имеют принципиального значения и не снижают общей положительной оценки диссертационной работы. Диссертация Алсовэйти Али Кадхим Мохаммед на тему: «Микробные сенсорные системы для определения антибиотиков в водных растворах» представляет собой законченную научно-квалификационную исследовательскую работу, которая по своей актуальности, методическому решению поставленных задач, большому объему выполненной работы, научной новизне и практической значимости соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а его автор Алсовэйти Али Кадхим Мохаммед, заслуживает присуждения ученой степени кандидата

биологических наук по научной специальности: 1.5.6 – Биотехнология.

Отзыв на диссертационную работу Алсовэйди Али Кадхим Мохаммед на тему: «Микробные сенсорные системы для определения антибиотиков в водных растворах» рассмотрен и одобрен на расширенном заседании Лаборатории биосенсоров Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»», протокол № 3 от 6 марта 2024 года.

Руководитель Лаборатории биосенсоров
Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук – обособленного подразделения
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный
центр биологических исследований Российской академии наук»»,
доктор химических наук, профессор

Решетиллов Анатолий Николаевич



21.03.2024

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН).
Министерство науки и высшего образования Российской Федерации.
Телефон: +7 (4967) 73-26-36. E-mail: info@pbcra.ru.

