

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента**

**о диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук  
Бородулевой Анны Юрьевны на тему: «Поляризационный флуоресцентный  
иммуноанализ для экспрессного определения пестицидов в зерне» по специальности  
03.01.06 – «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»**

Диссертационная работа Бородулевой А.Ю. посвящена разработке целой панели экспрессных систем иммуноанализа пестицидов. Эти многочисленные химические средства борьбы с сорняками (гербициды), насекомыми (инсектициды), патогенными грибами (фунгициды), грызунами (родентициды) и другими вредителями, без которых не обходится современное масштабное сельское хозяйство, не обладают абсолютной селективностью в отношении организмов-мишеней. В связи с этим, они могут вызывать серьезные экологические последствия, а также представлять опасность для здоровья населения.

В соответствии с «Гигиеническими нормативами содержания пестицидов в объектах окружающей среды и продуктах питания» загрязнение воды и сельскохозяйственной продукции не допускается выше максимально допустимого уровня, установленного для каждого из этих соединений. Обеспечение безопасности пищевой продукции требует контроля за большим перечнем соединений в самых разнообразных объектах исследования. В связи с этим особую актуальность приобретают скрининговые методы – быстрые, высокопроизводительные, недорогие и в тоже время достаточно чувствительные и специфичные. Таким требованиям удовлетворяют иммунохимические методы анализы, в частности поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА). Создание аналитических систем на основе ПФИА для выявления 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты, триазофоса, карбарила, тетраконазола и тиабендазола в зерне злаковых, разработка единой процедуры подготовки образцов и подтверждение правильности проводимых измерений и адекватности пробоподготовки с помощью ВЭЖХ-МС/МС определяло основные задачи исследования.

Диссертационная работа изложена на 157 страницах и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка литературных источников и приложения со структурными формулами и масс-спектрами трейсеров. Работа содержит 35 таблиц и 33 рисунка, а список цитируемой литературы включает 205 источников.

Литературный обзор посвящен рассмотрению сферы применения пяти пестицидов 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тетраконазола и тиабендазола, механизма их действия, возможных токсических проявлений при контакте и нормирования в

сельскохозяйственной продукции и продуктах питания. Существующие аналитические подходы для определения и идентификации данных пестицидов описаны в главе «Методы определения пестицидов» разделены на две группы скрининговые и подтверждающие методы. Особенно подробно рассмотрены иммунохимические методы определения этих 5 препаратов. Изрядный перечень разработанных иммунохимических методов, использующих в качестве метки ферменты, флюорофоры, различные частицы, для анализа каждого из рассматриваемых в работе пестицидов содержит подробные аналитические характеристики с указанием исследуемых объектов, их пробоподготовки, и временных затрат на анализ. Представленные сведения дают представление о масштабе исследований в данной сфере и обладают справочной ценностью для специалистов в области контроля пестицидов. Стоит отметить, что в представленных работах основными объектами исследования служили вода, биожидкости организма, фруктовые и овощные культуры, а также продукты их переработки. Анализ зерновых представлен в единичных работах. Невелика также доля работ, посвященных созданию экспрессных методов на основе поляризационного флюоресцентного иммуноанализа этой пятерки аналитов. Диссертационное исследование Бородулевой А.Ю. восполняет этот пробел.

Экспериментальная часть работы содержит материалы и методы исследований. Данный раздел изложен на 10 страницах и описывает процедуры синтеза производных флюоресцеина, приготовления трейсеров, оптимизацию и проведение ПФИА, ВЭЖХ-МС/МС, пробоподготовку и анализ образцов зерна.

В главе «Результаты и их обсуждение» представлены структуры 29 трейсеров, синтезированных на основе флюорофора и производных пестицидов, разделенных спейсером разной длины цепи от C2 до C7. Синтез 28 из них представлен в работе впервые. Определены оптимальные условия ПФИА 5 аналитов: концентрации иммунореагентов, необходимое время инкубации, выбраны трейсеры, использование которых позволяет достичь наилучшей чувствительности анализа и минимизировать затраты реагентов, а также увеличить рабочий диапазон анализа 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола.

Исследование специфичности разработанных систем, представленное в отдельном разделе, свидетельствует о селективности ПФИА-систем триазофоса, карбарила и тиабендазола. Перекрестная реактивность для 2,4-Д антител в отношении для практически используемых и разрешенных к применению препаратов также не выявлена. Разработанная тест-система для определения тетраконазола является групп-специфичной и позволяет выявлять также пенконазола и ципроконазол.

Немаловажной задачей при разработке аналитических систем является адаптация анализа для измерения содержания аналита в матриксе и выбор условий пробоподготовки, нивелирующих матрикс-эффект и обеспечивающих максимальное извлечение аналита из образцов. Было выяснено, что для ПФИА триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола таковым требованиям отвечает 30 минутная ультразвуковая экстракция 70% метанолом, центрифугирование с последующим разбавлением экстракта в 4 раза (для

карбарила) и в 8 раз - для триазофоса, тиабендазола и тетраконазола. ПФИА 2,4-Д потребовал поиска индивидуальных условий пробоподготовки, которые бы обеспечили эффективную экстракцию и адекватное извлечение аналита из экстракта зерна. Такие условия были найдены и включали 30 мин ультразвуковую экстракцию карбонатным буферным раствором с 5% метанолом, с последующим 4-кратным разбавлением экстрагентом и центрифугирование 5 мин при 1400 g. Предложенные условия пробоподготовки обеспечили уровень открытия 60-112% в тестах с искусственной контаминацией образцов и хорошую корреляцию 0.97 - 1.0 с подтверждающим методом ВЭЖХ-МС/МС.

Выводы, представленные в работе, согласуются с полученными результатами, логичны и обоснованы. Автореферат диссертации полностью отражает результаты и выводы проведенной работы. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений – они опубликованы в 4 изданиях, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus и входящих в перечень журналов ВАК и представлены в виде докладов на 4 российских и международных научных конференциях.

Работа не лишена некоторых незначительных недостатков:

- При выборе сокращений лучше придерживаться единых принципов, это облегчило бы восприятие материала: ЭДФ – этилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>ДФ – пропиленДФ, (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>ДФ – гептаметиленДФ;
- Термин «Коатинг антиген» (стр 30) был бы понятнее для широкой аудитории неспециалиста в виде «иммобилизованный антиген» или «адсорбированный на твердой фазе антиген».
- Представление автора о гомо- и гетерологичности иммунореагентов (на стр 64) отличается от общепринятого, которое обычно определяется по отношению к структуре иммуногена, а не аналита. Последующие заявления автора противоречат этому принципу - «В данной работе для анализа всех веществ использовали моноклональные антитела, полученные при иммунизации гомологичными иммуногенами». При этом только 2,4-Д аналит являлся гаптеном, остальные 4 аналита требовали дериватизации для получения иммуногенов, то есть имели гетерологичную структуру.
- Титр антител определялся как концентрация антител, дающая 50% связывание с меченым антигеном. Для каких целей определялся этот показатель объяснений в работе нет.
- Исследование аналитов по принципу «введено-найдено» должно быть привязано к МДУ установленному для конкретного соединения. Так, например, для тетраконазола исследовалось извлечение для концентраций 600-3000 мкг/кг, тогда как МДУ составляет – 200 мкг/кг.
- В таблицах 31, 32 нет объяснения, что такое Sr.
- В работе не хватает обоснования и выводов, касающихся эффекта использования трейсеров со спейсерами разной длины C2-C7. Гораздо больших сюрпризов можно было бы ожидать от использования трейсеров на основе гетерологичных гаптенов.

Указанные недостатки не умаляют значимости диссертационного исследования. Работа выполнена на хорошем методическом уровне с применением комплексного подхода для широкого спектра аналитов.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Бородулева Анна Юрьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,  
заведующий лабораторией биоконъюгатов,  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова».  
Буркин Максим Алексеевич

29 марта 2019

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 917 2753; e-mail: [burma68@yandex.ru](mailto:burma68@yandex.ru)

Специальность, по которой оппонентом защищена диссертация:

14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

Адрес места работы:

105064, Российская Федерация, Москва, Малый Казенный переулок, 5а  
ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова  
тел.: +7 (495) 917 2753; e-mail: [burma68@yandex.ru](mailto:burma68@yandex.ru)

Подпись сотрудника Буркина М.А. удостоверяю:

Начальник отдела кадров



Е.В. Лукачёва