

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Супрун Елены Владимировны
на тему «ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ
ДЛЯ АНАЛИЗА КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.01.04 – биохимия

Актуальность темы диссертации

Биохимические исследования, связанные с характеристикой белков, определением их концентрации, оценкой ферментативной активности, выявлением посттрансляционных модификаций и мутаций, имеют большое значение в медицине при изучении причин возникновения заболеваний, поиске биомаркеров и диагностике. Актуальной является задача разработки новых способов детекции белковых молекул, упрощающих и удешевляющих получение необходимой информации в короткий срок как в условиях специализированной лаборатории, так и «у постели больного». Глобальные протеомные исследования последнего десятилетия позволили выявить множество ранее неизвестных белков и пептидов, изменение структуры и концентрации которых, свидетельствует об отклонении организма человека от нормы на начальной или поздней стадии заболевания. Внедрению данных знаний в медицинскую практику препятствуют трудоемкость и дороговизна имеющихся мощных аналитических систем, включая, масс-спектрометрию, атомно силовую микроскопию, поверхностный плазмонный резонанс и др. Прогресс в области электрохимии, достигнутый за последние годы, представляется определяющим в развитии сенсорных и биосенсрных технологий детекции белков. Электрохимические методы анализа характеризуются высокой чувствительностью, широким диапазоном определяемых концентраций, минимальным эффектом матрицы пробы, относительной дешевизной, простотой эксплуатации и возможности миниатюризации оборудования. Сегодня электрохимические сенсоры стали общедоступным средством самоконтроля во всем мире, в частности при определении уровня глюкозы в крови у больных диабетом. Создание

электрохимических сенсоров для определения уровня белков – перспективное направление развития сенсорных технологий.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Основные положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации, данные в работе, хорошо обоснованы и подкреплены публикациями в российских и международных журналах. Объектами исследования автора стали белки и пептиды, значимые для медицинской диагностики и биохимических исследований молекулярного механизма заболеваний. При разработке электрохимических способов детекции белков и пептидов были использованы различные дополнительные физико-химические методы анализа: сканирующая электронная микроскопия, спектрофотометрия, динамическое светорассеяние, иммунохроматография. Экспериментальная часть диссертации логически выстроена и выполнена на высоком профессиональном уровне. Объектом исследования диссертанта являются белки и пептиды. Объем исследований является достаточным для подтверждения выдвинутых гипотез и обоснования выводов.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, трех глав с результатами и их обсуждением, заключения, выводов и списка библиографических ссылок, содержащего 360 источников. Работа изложена на 290 страницах машинописного текста, содержит 101 рисунок и 25 таблиц. Диссертация снабжена большим количеством иллюстраций и таблиц, существенно облегчающих восприятие материала. В обзоре литературы освещены вопросы электрохимической активности белков, затронуты некоторые теоретические аспекты вольтамперометрии, обсуждены примеры электрохимических (био)сенсорных систем для детекции белков и пептидов. Представляет интерес раздел, посвященный имеющимся на рынке анализаторам и тест-системам для детекции белков «у постели больного», где приводятся схемы работы и аналитические характеристики ряда устройств. Большинство из них построено на иммунохроматографическом принципе детекции. Однако за последние годы был сделан большой шаг в сторону миниатюризации электрохимического оборудования, что позволяет рассматривать электрохимические методы

анализа как наиболее перспективные в создании сенсорных систем для анализа «у постели больного».

Автор использует явление прямого переноса электрона в редокс-активных белках для количественного определения гемопротейна миоглобина – одного из ранних маркеров острого инфаркта миокарда. На примере инфаркта миокарда разработан способ распознавания заболеваний по электрохимическому «профилю» плазмы крови. Стоит особо отметить, что в работе над электрохимическими сенсорами для диагностики острого инфаркта миокарда были использованы образцы крови больных и здоровых доноров, собранные специально для проведенного исследования на базе Центральной клинической больницы № 1 ОАО «Российские железные дороги».

С помощью квадратно-волновой вольтамперометрии удалось зарегистрировать сигналы окисления белков, обусловленные аминокислотными остатками и отнести каждый полученный на вольтамперограмме сигнал к определенному виду аминокислот. Было исследовано электрохимическое поведение амилоида-бета – пептида, играющего ключевую роль в молекулярном механизме развития болезни Альцгеймера. Показано окисление амилоида-бета за счет аминокислотных остатков тирозина, гистидина и метионина. На основе экспериментов с различными изоформами пептида разработаны способы идентификации пептидов, регистрации образования их комплексов с ионами металлов, агрегации молекул, позволяющие проводить оценку влияния различных факторов на изучаемые процессы, что может быть использовано в биохимических исследованиях возникновения и развития болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний. В работе получены новые знания об электрохимических свойствах белковых молекул и разработаны сенсорные и биосенсорные системы для их качественного и количественного определения. Сделанные выводы подкреплены большим числом контрольных экспериментов.

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Экспериментальная часть выполнена на высококласном аналитическом

оборудовании. В работе использованы данные молекулярного моделирования и математической статистики. Используемые в работе методы статистической обработки результатов измерений являются общепринятыми и позволяют оценить достоверность полученных данных.

Научная новизна работы

Работа диссертанта характеризуется высокой степенью научной новизны. Впервые редокс-активность белка (на примере гемопротейна миоглобина) использована для его количественного определения в образцах плазмы крови. Достигнутые аналитические характеристики разработанного иммуносенсора на миоглобин перспективны для его использования при ранней диагностике острого инфаркта миокарда. Разработан метод распознавания острого инфаркта миокарда на основе хемотрического анализа характеристик вольтамперных кривых плазмы крови с использованием сенсора без каких-либо биораспознающих элементов (антител, аптамеров и т.д.). Особый интерес представляют данные, полученные при изучении закономерностей окисления белков, обусловленных аминокислотными остатками. С использованием молекулярного моделирования обнаружена зависимость электрохимического сигнала окисления белков от поверхностной плотности электроактивных аминокислотных остатков (тирозина, триптофана и цистеина), что дает возможность прогнозирования электрохимических свойств белковых молекул, опираясь на их структуру. На основе регистрации электрохимических сигналов окисления электроактивных аминокислотных остатков продемонстрирована эффективность электрохимического анализа в детекции комплексообразования белков и пептидов с ионами металлов, агрегации пептидов и выявлении аминокислотных замен и модификаций в их структуре. Помимо этого, разработаны способы детекции белков с помощью инверсионной вольтамперометрии на основе электрохимических сигналов наночастиц золота и серебра, нанесенных на поверхность электродов совместно с биораспознающими элементами – аптамерами.

Очевидной является научно-практическая значимость диссертационной работы, так как разработанные способы анализа применимы для широкого круга представляющих интерес белковых молекул. Схемы биосенсорного и

сенсорного электрохимического анализа, разработанные диссертантом, можно использовать в различных биохимических исследованиях по поиску механизмов и маркеров заболеваний, определению белков в биологических образцах, изучению поведения белков *in vitro*, выявлению модификаций белковых молекул.

Полнота изложения основных результатов диссертации в научной печати

По материалам диссертации опубликовано 40 работ, в том числе 19 статей в научных рецензируемых изданиях: из них 5 в российских и 14 в международных научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 2 главы в коллективных монографиях, 2 патента и 17 публикаций в материалах конференций. В данных работах достаточно полно отражены результаты диссертационного исследования.

Оценка содержания диссертации в целом, замечания и вопросы по диссертации

Диссертация Е.В. Супрун заслуживает высокой оценки. Работа изложена научным стилем, логично выстроена, основана на фундаментальных знаниях в области химии, биохимии и медицины. Полученные автором результаты достоверны и обладают научной и практической ценностью, выводы обоснованы. Тем не менее, остается ряд невыясненных вопросов.

1. При электролизе водных растворов различных низкомолекулярных веществ, например галогенидов, в качестве продуктов электрохимической реакции могут образовываться реакционные соединения, такие как пероксид водорода или гипохлорит. Не могут ли такие реакции повлиять на результат при определении белков электрохимическим методом?

2. При регистрации биомаркеров белкового происхождения патологий, связанных с воспалением, в очаге воспаления образуются активные формы кислорода, азота, галогенов и другие реакционные соединения, которые могут модифицировать различные аминокислотные остатки белка-биомаркера, например, церулоплазмينا. Может ли это повлиять на регистрируемый электрохимический сигнал окисления белков за счет аминокислотных остатков?

3. Как рассчитывались пределы обнаружения исследуемых белков?

Указанные неясности ни в коей мере не снижают ценности работы. Диссертация Е.В. Супрун является законченным научным исследованием, которое, безусловно, является научным достижением в области биохимии белков и пептидов и вносит существенный вклад в понимание электрохимических свойств белковых молекул и развитие способов их детекции. В работе созданы электрохимические сенсорные и биосенсорные системы для количественного определения белков и пептидов, регистрации образования их комплексов с ионами металлов и агрегации, аминокислотных замен и модификаций в структуре молекул, что соответствует паспорту специальности 03.01.04 – биохимия: п.4 – Моделирование биохимических процессов; п.5. Анализ и синтез биологически активных веществ, выяснение их физиологического действия и возможностей применения полученных веществ в медицине и других отраслях народного хозяйства; п.7. Исследование структуры и функциональной активности комплексов неорганических ионов с органическими молекулами, их участия в процессах жизнедеятельности; п.10. Теоретические и прикладные проблемы природы и закономерностей химических превращений в живых организмах, молекулярных механизмов интеграции клеточного метаболизма, связей биохимических процессов с деятельностью органов и тканей, с жизнедеятельностью организма для решения задач сохранения здоровья человека, животных и растений, выяснения причин различных болезней и изыскания путей их эффективного лечения; п.12 – Клиническая биохимия человека и животных.

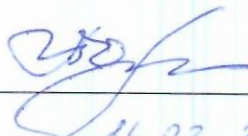
Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Содержание автореферата диссертационной работы Е.В. Супрун полностью соответствует основным положениям диссертации и отвечает требованиям ВАК Минобрнауки России.

Заключение

Считаю, что диссертационная работа Супрун Елены Владимировны «Электрохимические биосенсорные системы для анализа клинически значимых белков и пептидов» является законченной научно-квалификационной работой и по своей актуальности, научной новизне, практической значимости отвечает требованиям п.9 Положения "О порядке присуждения ученых степеней" N 842 от 24 сентября 2013 г. с внесенными изменениями от 21 апреля 2016 г. № 335, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Руководитель лаборатории физико-химических методов исследования и анализа Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», доктор биологических наук, профессор

 Олег Михайлович
Панасенко
16.02.2017г.

Россия, Москва, 119435, ул. Малая Пироговская, д. 1а.

Телефон: 8-(499)-246-44-90 (раб.).

Адрес электронной почты: o-panas@mail.ru.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства».

Подпись профессора О.М. Панасенко
заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», кандидат биологических наук



Л.Л. Васильева