

ОТЗЫВ

официального оппонента

Егорова Алексея Михайловича,

доктора биологических наук, профессора, академика РАН

на диссертационную работу Супрун Елены Владимировны «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 исследования

Изучение электрохимических свойств белков и пептидов с целью разработки новых способов определения содержания белковых молекул в образце и выявления изменений в их структуре является актуальным для решения задач биохимии и медицины, таких как поиск молекулярных механизмов развития заболеваний и персонализированный подход к их лечению. Электрохимические методы анализа, благодаря своей чувствительности, широкому диапазону определяемых концентраций, относительной дешевизне расходных материалов, мобильности и миниатюрности оборудования, представляются перспективными для создания аналитических систем, способных служить как в специализированных лабораториях, так и «у постели больного». Современные биохимические исследования опираются на данные о структуре, концентрации или ферментативной активности определяемого белка в пробе, а также на информацию об изменении его конформации, вызванную аминокислотными заменами и модификациями, образованием комплексов и агрегатов.

В исследовании были поставлены задачи разработать методы количественной электрохимической детекции белков с использованием их редокс-активных простетических групп; хеометрического анализа вольтамперных кривых плазмы крови; детекции белков на основе сигнала наночастиц металлов, нанесенных на поверхность электродов. Поиск

взаимосвязи между структурой (аминокислотным составом и конформацией) белка и его электрохимической активностью и разработка методов регистрации образования комплексов между пептидами (белками) и ионами металлов; агрегации белковых молекул; выявления аминокислотных замен и модификаций, является новым направлением в биоэлектрохимии. Поставленные в работе задачи являются актуальными не только в научном плане, но также в решении проблем медицины и биотехнологии.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Е.В. Супрун выстроена в классическом стиле и включает введение, обзор литературы по теме исследования, экспериментальную часть, три главы, отражающие полученные результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список библиографических ссылок, содержащий 360 источников. Работа изложена на 290 страницах машинописного текста, содержит 101 рисунок и 25 таблиц.

Во введении дано аргументированное обоснование актуальности выбранной темы исследования, сформулированы цель и задачи, изложена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, кратко описаны методология и методы диссертационного исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы на тему «Электрохимический анализ белков и пептидов» систематизирует знания об электрохимических свойствах белковых молекул и способах их детекции методами электрохимии. Автор дает историческую ретроспективу развития электрохимического анализа белков. Подробно рассмотрены примеры электрохимических (био)сенсорных систем для детекции белков и пептидов, по типу электрохимической реакции, лежащей в основе регистрируемого сигнала, разделенных на три группы: окисление аминокислотных остатков молекул; прямой перенос электрона в кофактор-содержащих белках; косвенные электрохимические

процессы. Заключительный раздел обзора «Коммерческие тест-системы для детекции белков «у постели больного»» на примере диагностики острого инфаркта миокарда дает представление о месте и перспективах коммерциализации электрохимических сенсоров в сфере анализа «у постели больного».

Следует отметить, что обзор литературы выполнен диссертантом на высоком профессиональном уровне, логично выстроен, хорошо иллюстрирован и дает полное представление об истории и современных тенденциях в выбранном направлении исследования. Автором рассмотрено более 200 публикаций отечественных и зарубежных научных групп с 1930 по 2016 гг. После каждого раздела сделаны ёмкие заключения, шаг за шагом подводящие читателя к восприятию экспериментального материала диссертации. Обзор литературы, дополненный ссылками на работы самого автора, безусловно, представляет интерес для широкого круга исследователей – биохимиков и химиков, и заслуживает публикации в рецензируемом научном журнале.

В «Экспериментальной части» диссертации подробно описаны реактивы, препараты и биообразцы, использованные в работе, оборудование и материалы на которых проводилось исследование, методики изготовления и применения разработанных сенсоров и биосенсоров, параметры электрохимического анализа аминокислот, пептидов и белков, математические формулы для расчетов, молекулярное моделирование структур белков и хемометрический анализ данных вольтамперограмм. Для удобства группы формул соединений и полученные исходные параметры сведены в отдельные таблицы. Одним из несомненных достоинств работы является использование образцов плазмы крови пациентов с острым инфарктом миокарда и здоровых доноров, которые были собраны специально для проводимого исследования на базе Центральной клинической больницы № 1 ОАО «Российские железные дороги». Каждый образец был

охарактеризован по содержанию белков-кардиомаркеров: креатинфосфокиназы-MВ, миоглобина и кардиотропонина I независимым методом – иммунохроматографическим анализом с помощью анализатора RAMP® 91001 (Response Biomedical Corp., Канада).

В своей работе автор использует различные электрохимические методы анализа в комплексе с другими физико-химическими методами, математической статистикой и молекулярным моделированием, раскрывая возможности электрохимии дополнять и заменять более трудоемкие и дорогостоящие экспериментальные методы анализа.

Далее идут три главы с описанием результатов и их обсуждением. В основу разработанных методов анализа заложены электрохимические свойства самих белковых молекул. Супрун Е.В. показывает, что редокс-активные простетические группы – высокочувствительные индикаторы белка в биологическом образце, перспективные как для прямого количественного определения интересующего маркера, так и распознавания заболеваний, сопровождающихся резким изменением содержания белков в крови, на основе хеометрического анализа. Способ определения концентрации белков с использованием их редокс-активных простетических групп лег в основу иммуносенсора для детекции миоглобина – одного из наиболее ранних биомаркеров острого инфаркта миокарда. По своим аналитическим характеристикам разработанный иммуносенсор не уступает промышленно выпускаемым анализаторам и обладает рядом преимуществ, среди которых портативность и относительно низкая стоимость электрохимического оборудования и расходных материалов. Второй метод, разработанный для диагностики острого инфаркта миокарда, основан на хеометрическом анализе вольтамперограмм образцов плазмы крови. Полученные результаты показывают возможность разделения образцов крови здоровых доноров и пациентов с острым инфарктом миокарда на

основе простого электрохимического анализа, не требующего специальных меток или дорогостоящих иммунохимических реагентов.

Для определения содержания белков, не имеющих в своей структуре простетических групп, автором разработаны оригинальные способы детекции с использованием электрохимического сигнала наночастиц золота и серебра, предварительно иммобилизованных на поверхности сенсора, снабженного специфическим аптамером, который является биораспознающим элементом. Связывание аптамера с антигеном приводит к изменению структуры комплекса на поверхности наночастиц. При этом в случае наночастиц золота облегчается их окисление кислородом при потенциале 1.2 В, что ведет к увеличению регистрируемого электрохимического сигнала восстановления оксида золота, который пропорционален концентрации антигена. Сигналом аптасенсора на основе наночастиц серебра служит пик окисления серебра на поверхности электрода. Процесс окисления (растворения) серебра затрудняется при образовании комплекса аптамер-белок. Величина регистрируемого сигнала окисления серебра обратно пропорциональна концентрации определяемого белка. Таким образом, данные схемы анализа позволяют проводить определение белка без применения дополнительных реагентов.

Четвертым направлением исследования стал поиск количественных зависимостей между строением белковых молекул и электрохимическими свойствами их аминокислотных остатков, а также использование выявленных закономерностей для регистрации образования комплексов с ионами металлов, агрегатов, выявления аминокислотных замен и модификаций. На основе молекулярных моделей белков показано, что площадь пика окисления белков при потенциале 0.6–0.7 В прямо пропорциональна плотности электроактивных остатков тирозина, триптофана и цистеина, расположенных на поверхности молекулы. Только определенным способом ориентированные аминокислотные остатки,

локализованные на поверхности белка, могут участвовать в электрохимических реакциях. Ярким примером демонстрации возможностей электрохимического анализа стал амилоид-бета – пептид, играющий ключевую роль в молекулярном механизме болезни Альцгеймера. Изучение электрохимических свойств белков, обусловленных их аминокислотным составом, представляется чрезвычайно важным и перспективным для разработки широкого круга сенсорных и биосенсорных устройств, необходимых в биохимических лабораториях, изучающих различные физиологические процессы, а также развития биохимического анализа и медицинских технологий.

Новизна и практическая значимость

Таким образом, автором разработан алгоритм применения электрохимических методов для детекции белков на основе данных об их структуре и электрохимических свойствах, которые и определяют выбор стратегии анализа. Супрун Е. В. разработаны способы количественного определения белков как содержащих редокс-активные кофакторы (на примере гемопротейна миоглобина), так и состоящих только из аминокислотных остатков (на примере тромбина). Получены новые знания о электрохимической активности белков и пептидов, обусловленной аминокислотными остатками, Найдена зависимость между электрохимической активностью белков и пептидов и их структурой (поверхностной плотностью электроактивных аминокислотных остатков) и разработаны методы регистрации комплексообразования белковых молекул с ионами металлов, агрегации и выявления аминокислотных замен и модификаций.

Практическая значимость работы определяется апробацией разработанных диссертантом электрохимических способов детекции белков и пептидов, основанные на использовании как электроактивных

аминокислотных остатков, так и редокс-активных кофакторов, на клинически значимых системах. Заложены основы электрохимического анализа патогенной агрегации и формирования комплексов с ионами металлов бета-амилоидного пептида, который играет важную роль в патогенезе болезни Альцгеймера. Диссертантом был создан иммуносенсор, позволяющий количественно определять содержание миоглобина – раннего маркера острого инфаркта миокарда – в плазме крови в норме и при остром инфаркте миокарда. Был разработан метод распознавания острого инфаркта миокарда на основе хемотрического анализа электрохимического «профиля» (вольтамперных характеристик) исследуемого образца плазмы крови, использующий комбинацию методов циклической и квадратно-волновой вольтамперометрии.

Степень обоснованности и достоверность научных положений и выводов

В целом вся экспериментальная работа выполнена на высоком техническом и методическом уровне. Выводы, представленные в диссертационной работе, полностью обоснованы и соответствуют полученным результатам. В работе использованы различные электрохимические методы (циклическая, инверсионная, квадратно-волновая вольтамперометрия), а также другие физико-химические методы исследования биомолекул, такие как сканирующая электронная микроскопия, спектрофотометрия, динамическое светорассеяние, и методы молекулярного моделирования. Статистическая обработка экспериментальных данных проведена корректно. Достоверность полученных результатов подтверждается согласованностью между экспериментальными данными, полученными с использованием различных физико-химических и биохимических методов, а также согласием с известными знаниями о строении и функции белков и пептидов.

Замечания и рекомендации

К материалу, изложенному в диссертации, есть некоторые замечания и пожелания. Было бы полезно представить в литературном обзоре более широкий спектр методов анализа белков (например, в виде таблицы), использующихся как в специализированных лабораториях, так и портативных устройствах, работающих «у постели больного», и показать место, занимаемое электрохимическим анализом. При описании результатов и их обсуждении автору следовало бы привести константы взаимодействия исследуемых пар антиген-антитело и белок-аптамер и связать их с достигнутыми аналитическими характеристиками разработанных методов детекции белков.

Следует подчеркнуть, что указанные замечания не носят принципиального характера и ни в коей мере не снижают ценности рассматриваемой работы.

Автореферат диссертации

Автореферат диссертации Е.В. Супрун четко отображает основные положения работы и полностью соответствует установленным требованиям ВАК Минобрнауки России. Полученные автором результаты опубликованы в престижных международных рецензируемых журналах, а индекс Хирша автора составляет 11 по данным баз Scopus и Web of Science.

Заключение

На основе вышесказанного следует сделать вывод, что диссертация Е.В. Супрун вносит существенный вклад в развитие биохимических методов анализа белков и пептидов. Полученные автором результаты достоверны и обладают научной и практической значимостью, все выводы обоснованы. Диссертационная работа Супрун Елены Владимировны «Электрохимические биосенсорные системы для анализа клинически значимых белков и

пептидов» является законченной научно-квалификационной работой и 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».

Главный научный сотрудник
кафедры химической энзимологии
Химического факультета
Федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Московский государственный
университет имени М.В.
Ломоносова», доктор
биологических наук, профессор,
академик РАН


22.02.2017г.

Алексей Михайлович
Егоров

Декан Химического факультета МГУ имени
М.В.Ломоносова, академик РАН, профессор



Валерий Васильевич
Лунин

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова», Химический факультет, кафедра химической
энзимологии

119991 Россия, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1 стр. 11Б

Телефон: 8-495-939-27-27 (раб.)

Адрес электронной почты: alex.m.egorov@gmail.com