

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

Молекулы белков и пептидов, благодаря многообразию и важности выполняемых ими функций в организме человека, представляют большой интерес при исследовании путей развития заболеваний, их диагностике и поиске лекарственных средств. Не случайно на смену международному проекту «Геном человека» пришел проект «Протеом человека», направленный на измерение содержания продуктов экспрессии генов – белков. Внимание исследователей, помимо поиска новых белков-маркеров и определения их концентрации или ферментативной активности в норме и при патологии, направлено на выявление посттрансляционных модификаций белков и пептидов. Несомненно, в распоряжении специалистов сегодня имеется мощный спектр аналитических методов определения структуры, количества и ферментативной активности белков. Это, прежде всего, оптические методы и масс-спектрометрия. Однако определение белка с помощью указанных методов требует в большинстве случаев лабораторных условий, высококвалифицированного персонала и не доступно в варианте «у постели больного». Существующая потребность в надежных и относительно недорогих устройствах для определения концентрации белков и пептидов и установления изменений в их структуре для диагностики и биохимических исследований может быть удовлетворена посредством создания различных сенсорных систем, включая биосенсорные системы. Благодаря таким достоинствам как высокая чувствительность, широкий диапазон

определяемых концентраций, относительная дешевизна, простота эксплуатации и возможность миниатюризации оборудования, а также разнообразию используемых материалов, электрохимические методы анализа представляются наиболее перспективными для разработки таких устройств. Создание биосенсорных систем, действующих по принципу «у постели больного» и пригодных для широкого круга потребителей, требует разработки новых методов детекции белков и пептидов. Конструирование электрохимических сенсоров для определения концентрации и установления изменений в структуре белков и пептидов может быть осуществлено при использовании электроактивных материалов (например, наночастиц металлов), или же на основе собственной электроактивности белковых молекул, обусловленной редокс-активными простетическими группами и/или электроактивными группами аминокислотных остатков. Именно этим аспектам и посвящена данная диссертационная работа. Таким образом, **актуальность проблемы исследований** не вызывает сомнений.

Диссертация изложена на 290 страницах, содержит 25 таблиц и 101 рисунок. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, заключения, выводов, списка сокращений и обозначений, а также библиографии. Некоторую необычность докторской работе придает наличие в ней главы «Экспериментальная часть». Однако присутствие этой главы позволяет правильно оценить адекватность использованных автором методов.

Во введении, помимо общей характеристики работы и изложения актуальности темы диссертации, также сформулированы цели и задачи исследования. Первая глава диссертационной работы содержит обзор литературы, состоящий из четырех основных частей. Первая часть посвящена электрохимии белка, а во второй описываются некоторые теоретические аспекты вольтамперометрии. В третьей части – электрохимические (био)сенсорные системы для детекции белков и

пептидов, в то время как пятая часть обзора литературы посвящена описанию коммерческих тест-систем для детекции белков «у постели больного».

Во второй главе описаны материалы и методы исследования, включая использованные реактивы, препараты, биообразцы, оборудование и материалы, разработанные устройства и анализы, а также математические расчеты и моделирование. Следует отметить корректность автора работы, который, следуя требованиям ВАК, отмечает в тексте диссертации, какие именно эксперименты были выполнены в соавторстве с другими исследователями. Более того, автор подробно описывает источники получения реактивов, препаратов, расходных материалов (печатных электродов) и биообразцов, которые, во многих случаях, были не закуплены, а предоставлены для исследований российскими и зарубежными коллегами.

В третьей, четвертой и пятой главах представлены непосредственно экспериментальные результаты диссертационного исследования. Третья глава посвящена электрохимическим сенсорам для диагностики инфаркта миокарда, четвертая глава описывает два типа аптасенсоров для детекции тромбина на основе золотых и серебряных наночастиц, в то время как пятая глава сфокусирована на электрохимической активности белков и пептидов, обусловленной аминокислотными остатками.

В конце диссертационной работы делается заключение, и приводятся основные выводы, а также дается список цитируемой литературы, состоящий из 360 наименований, который включает в себя российские и зарубежные научные статьи, диссертационные работы, обзоры и книги.

Обоснованность научных положений, результатов, выводов и рекомендаций, выдвинутых и полученных соискателем, не вызывает сомнений и подтверждена публикациями в рецензируемых научных изданиях. Научные положения, выводы и рекомендации основываются на большом объеме экспериментальных данных. Результаты, полученные с помощью электрохимического и других физико-химических методов,

хорошо согласуются между собой и с опубликованными ранее данными. Полученные результаты и сделанные выводы подкреплены соответствующими математическими и статистическими расчетами, а также молекулярным моделированием. Объем исследования является достаточным для подтверждения выдвинутых гипотез.

Достоверность экспериментальных данных обеспечивается использованием современных средств и методик проведения исследований. Достоверность полученных результатов также подтверждена соответствующими статистическими характеристиками воспроизводимости экспериментальных данных и независимыми методами анализа. Результаты работы согласуются с известными теоретическими и практическими знаниями по теме диссертации, полученными другими группами исследователей с помощью электрохимических или альтернативных физико-химических и биохимических методов.

Научная новизна диссертации Е.В. Супрун очевидна, наиболее существенными результатами являются:

- методология определения концентраций белков, содержащих редокс-активные простетические группы, путем регистрации прямого переноса электрона между электродом и редокс-активным кофактором;
- количественная зависимость электрохимического сигнала окисления белков от плотности электроактивных аминокислотных остатков (тирозина, триптофана и цистеина), локализованных на поверхности молекул;
- способ регистрации образования комплексов между молекулами пептидов (белков) и ионами металлов, позволяющего проводить оценку влияния различных факторов на процесс комплексообразования;
- метод электрохимического анализа детекции агрегации пептидов и выявления аминокислотных замен и модификаций в их структуре;

- способы детекции белков с помощью инверсионной вольтамперометрии на основе электрохимических сигналов наночастиц золота и серебра, нанесенных на поверхность электродов совместно с биораспознающими элементами;
- метод распознавания острого инфаркта миокарда на основе хеометрического анализа характеристик вольтамперных кривых плазмы крови.

Практическая значимость результатов работы Супрун Е.В., новизна и оригинальность этих разработок поддержаны двумя патентами РФ на изобретения.

В целом, результаты, полученные автором, являются новыми научными знаниями в областях биохимии и энзимологии, биоэлектрохимии и аналитической химии. 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, 2 главы в коллективных монографиях и 2 патента. Индекс Хирша автора составляет 11 по данным систем Scopus и Web of Science. Основные положения диссертационной работы были представлены в виде устных докладов и стендовых сообщений на российских и международных конференциях (17 публикаций в материалах конференций).

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

В то же время, при прочтении диссертационной работы и автореферата возникли некоторые замечания:

1. Математический аппарат, представленный в разделе литературного обзора «1.2. Некоторые теоретические аспекты вольтамперометрии», недостаточно использован при обработке полученных экспериментальных биоэлектрохимических данных.
2. Рисунки, математические формулы и уравнения содержат небольшое количество неточностей. Например, в формуле 1.2.5 присутствует лишний графический символ, в формулах 1.2.22 и 1.2.23 отсутствует площадь, а схема на рисунке 1.1.5 является спорной.
3. Несмотря на очень грамотный язык диссертации в целом, текст документа все же содержит небольшое количество опечаток, а также оборотов, не совпадающих с лексическими нормами научной литературы, например, «метолам» (страница 82) и «продолжительность жизни белка» (страница 47), соответственно.
4. Несмотря на отличное знание автором литературы по теме диссертации, в ряде случаев отсутствуют необходимые ссылки на научные источники, например, на странице 28 «...искусственного медиатора должна быть не менее 50 мВ.».
5. При цитировании литературных источников имеются определенные неточности, например, неверный порядок авторов в ссылках номер 107 и 108 на странице 263.

Сделанные замечания не меняют общего положительного впечатления о выполненной работе и абсолютно не снижают ее научной и практической ценности. Полученные автором результаты достоверны, выводы и заключения обоснованы. В целом работа, написанная очень грамотным языком и аккуратно оформленная, базируется на достаточном числе исходных данных, примеров и расчетов. Материал диссертации изложен последовательно, читается легко и интересно. По всему тексту автором четко выделены текущие задачи исследования и частные выводы, обобщения результатов присутствуют в конце каждой главы диссертации, что

существенно упрощает восприятие большого объема представленной информации.

Таким образом, 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.

Ведущий специалист
лаборатории Белковая фабрика
Курчатовского комплекса
НБИКС-технологий НИЦ
«Курчатовский институт»,
доктор химических наук

Сергей Валерьевич Шлеев



27 февраля 2017 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный
Исследовательский Центр "Курчатовский институт"
123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1
Телефон: +79161328601, Адрес электронной почты: shleev@hotmail.com,

Подпись Сергея Валерьевича Шлеева заверяю:

Главный учёный секретарь
НИЦ «Курчатовский институт»



С.Ю. Стремоухов