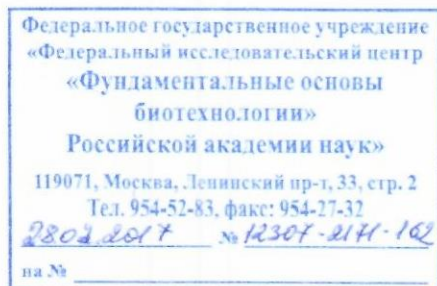


“УТВЕРЖДАЮ”

Директор

Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук,
член-корреспондент РАН



В.О. Попов

«28» февраль 2017 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Елены Владимировны Супрун «Электрохимические биосенсорные системы для анализа клинически значимых белков и пептидов», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Детекция маркеров различных заболеваний и дисфункций является неотъемлемым элементом современной медицинской диагностики. На сегодняшний день специалисты располагают значительным числом аналитическим методов, обеспечивающих селективное детектирование тех или иных маркеров в диагностически значимых диапазонах концентраций. Однако разработки в этой области продолжают активно развиваться, что связано как с потребностью в портативных дешевых системах для быстрого анализа, так и в необходимости учета при диагностике тех или иных структурных особенностей контролируемых соединений, не выявляемых традиционными методами. В этой связи крайне востребованными являются электрохимические методы анализа. Современные электрохимические биосенсорные системы компактны, позволяют работать с минимальными объемами тестируемых проб и обеспечивают быструю трансформацию селективного связывания целевых соединений в

электрохимический сигнал. Тем не менее большинство из существующих разработок электрохимических биосенсоров лабораторного назначения остаются на уровне лабораторных прототипов и апробируемых малых серий. Данная ситуация в значительной степени обусловлена недостаточной сравнительной характеристикой разных способов генерации сигнала, неизученными взаимосвязями между структурой детектируемых аналитов и их собственной электрохимической активностью. Появление новых эффективных решений, основанных на прямой (безмаркерной) детекции и эффективно работающих в матриксах биопроб, обеспечит высокий конкурентный потенциал таких аналитических систем и их массовое применение для решения разнообразных медико-диагностических задач.

С учетом вышеизложенного не вызывает сомнения **актуальность** диссертационной работы Е.В. Супрун, направленной на создание электрохимических биосенсорных и сенсорных систем медико-диагностического назначения для детекции белков и пептидов, регистрации комплексообразования, аминокислотных замен и модификаций в их структуре.

Подготовленная Е.В. Супрун диссертация и публикации по теме исследования отражают успешное решение поставленных задач, получение ряда новых научных результатов, имеющих большое фундаментальное и прикладное значение. Диссертационная работа изложена на 290 страницах машинописного текста, включает 101 рисунок и 25 таблиц. Состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, библиографии (360 ссылок) и благодарностей.

Во введении обосновывается актуальность исследования, обсуждаются существующие представления о типах биосенсоров и приоритетах их развития, формулируются цель и задачи диссертационной работы, дается ее общая оценка: научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследования, основные положения, выносимые на защиту, личный вклад соискателя, оценка степени достоверности результатов исследования. Приводятся сведения о представлении (апробации) основных положений диссертационной работы на научных мероприятиях, числе публикаций по теме диссертации, месте выполнения работы и ее финансовой поддержке.

В первой главе представлен обзор литературы по теме исследования, включающий работы по изучению электрохимии белков, теоретические и

методические основы вольтамперометрии. Кратко охарактеризованы основные направления осуществляемых разработок электрохимических биосенсорных систем для детекции белков и пептидов. Заключительный раздел первой главы посвящен изложению концепции point of care диагностики и особенностям ее реализации применительно к острому инфаркту миокарда. Предложенная структура обзора, охватывающая рассмотрение нескольких объемных взаимосвязанных проблем, позволяет дать комплексную оценку современного уровня разработок по предложенной теме исследования, ввести понятия и сформулировать базовые концепции, необходимые для интерпретации экспериментальных данных диссертанта. Анализ литературы, проведенный Е.В. Супрун, охватывает наиболее важные публикации по обсуждаемым в обзоре вопросам, включая как приоритетные работы, так и значительное число статей последних лет, и дает достаточно полное представление о достигнутых успехах и ограничениях существующих разработок (с этой целью автор использует краткие заключения по каждому из подразделов обзора). Глава хорошо структурирована, все формулируемые понятия четко и корректно изложены. В целом обзор литературных данных убедительно демонстрирует важность и актуальность выбранного автором направления исследований и позволяет оценить значимость диссертационной работы.

В главе 2 «Экспериментальная часть» представлены реактивы, приборы и экспериментальные методики использованные автором при проведении работ. Е.В. Супрун освоены и успешно применены методы функционализации печатных графитовых электродов, вольтамперометрических измерений, флуоресцентной характеристики структуры белков, математического моделирования структуры белков с целью описания их поверхностных свойств и локализации электроактивных аминокислотных остатков, расчета константы скорости обратимой электрохимической реакции, а также методы статистической обработки результатов измерений. Методический инструментарий исследования выбран в полном соответствии с решаемыми задачами, позволяет получать наиболее информативные результаты и проводить доказательные проверки выдвигаемых гипотез об электрохимических свойствах компонентов разрабатываемых аналитических систем.

В трех последующих главах диссертации представлены результаты проведенных экспериментов, сгруппированные в соответствии с основными

решаемыми задачами – разработка и характеристика электрохимических биосенсоров для диагностики острого инфаркта миокарда (глава 3), разработка электрохимических аптасенсоров для детекции тромбина с использованием различных наномаркеров (глава 4) и характеристика электрохимической активности различных белков и пептидов в свободном и агрегированном состояниях (глава 5). Данные главы подтверждают полноту проведенного исследования, успешность реализации поставленных задач по характеристике различных форматов электрохимической детекции клинически значимых белков и пептидов.

Представленные в диссертации эксперименты корректно спланированы и реализованы. Достоверность полученных результатов подтверждается их воспроизводимостью, охарактеризованной стандартными статистическими методами. Результаты работы согласуются с теоретическими и практическими знаниями, полученными другими группами исследователей с помощью электрохимических или альтернативных аналитических методов. Таким образом, обоснованность и достоверность сформулированных в диссертации положений, выводов и рекомендаций не вызывает сомнения.

Значимость для развития биохимии выполненного исследования определяется проведенной комплексной характеристикой возможностей детекции электрохимически активных белков и пептидов в различных форматах биосенсорного анализа, выявлением взаимосвязей между структурными характеристиками белка (пептида) и регистрируемым откликом аналитических систем. На основании установленных закономерностей становится возможным предлагать обоснованные рекомендации по эффективному выявлению в сложных матриксах белков и пептидов, имеющих диагностическое значение, разрабатывать новые решения по повышению чувствительности и точности детектирования. Результаты разработок предоставляют исследователям инструментарий по выявлению структурных перестроек и поверхностных модификаций белков, обеспечивающий возможность высокопроизводительных скрининговых исследований без привлечения дополнительных зондов, сложного регистрирующего оборудования.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, определяется достижением следующих наиболее принципиальных результатов:

В рамках фундаментальных исследований диссертантом разработана методология детектирования белков, содержащих редокс-активные группы, путем регистрации прямого переноса электрона. Показана корреляция электрохимического сигнала окисления с поверхностной плотностью электроактивных аминокислотных остатков (тирозина, триптофана и цистеина). Показаны возможности электрохимической детекции агрегации пептидов и выявления модификаций в их структуре. Охарактеризованы возможности применения наночастиц золота и серебра при генерации сигнала в инверсионной вольтамперометрии комплексообразования белков с селективными рецепторами.

В рамках прикладных исследований Е.В. Супрун создан иммуносенсор для определения содержания миоглобина – раннего маркера острого инфаркта миокарда. Разработан метод диагностики острого инфаркта миокарда путем хемотрического анализа вольтамперных кривых плазмы крови пациента. Разработаны подходы для оценки комплексообразования амилоидных структур, значимые для характеристики развития болезни Альцгеймера.

Все представленные в диссертационной работе результаты являются новыми, работа Е.В. Супрун полностью оригинальна. Новизна и значимость проведенного исследования определяется публикацией полученных результатов в 14 международных научных журналах.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания.

1 (раздел 3.1). Миоглобин и антитела к нему содержат электрохимически активные аминокислоты, восстанавливающиеся в исследуемой области потенциалов. Кроме того, электрохимические измерения проводили в аэробных условиях, т.е. в присутствии электроактивного диоксида. В связи с этим следовало бы представить в диссертации прямые подтверждения того, что рассматриваемый аналитический сигнал не искажается вследствие диоксида и/или аминокислот (например, данные экспериментов, проведенных в анаэробных условиях). Отметим также, что в плазме крови присутствует значительное количество электроактивных белков (например, церулоплазмин), способных неспецифически связываться с поверхностью электрода. Полнота их десорбции при отмывке должна быть подтверждена.

2 (раздел 3.2). На циклических вольтамперограммах (рисунок 3.2.2 В) в области потенциалов $-0,2 \div -0,4\text{В}$ для электрода ПГЭ/ДДАБ наблюдается

псевдообратимый процесс. К какой реакции он может относиться? Эта же пара катодного и анодного пиков при тех же потенциалах присутствует на циклических вольтамперограммах, записанных на электродах ПГЭ/ДДАБ в плазме крови здорового донора и пациента с ОИМ. За счет какой реакции при потенциалах ниже -0,4 В (Ag/AgCl) на циклических вольтамперограммах происходит возрастание катодного тока по сравнению с контрольным ПГЭ/ДДАБ электродом?

3 (раздел 4.1). Катодные токи в области потенциалов 0,5 ÷ -0,5 В и анодные токи в области 0,5 ÷ 1,5 В (Ag/AgCl) (рис. 4.1.2) диссертант объясняет сорбцией и десорбцией кислорода на поверхности ПГЭ/ДДАБ и ПГЭ/AuНЧ-ДДАБ электродов. Однако прямые доказательства сорбции и десорбции не получены. Для обоих электродов на катодном участке вольтамперограмм происходит электровосстановление диоксида, а природа анодной реакции требует дополнительного изучения с опытами в анаэробных условиях. Неясно, почему на контрольном ПГЭ в очень большом диапазоне потенциалов -0,5 ÷ 1,5В не наблюдается восстановления диоксида и электроокисления графита.

4 (раздел 5.2). Интерпретация рис. 5.2.1 неоднозначна в отсутствие данных о концентрации ДМСО. При высоком содержании ДМСО в электролите в аэробных условиях кислород может восстанавливаться до супероксид-анион радикала, который реагирует с некоторыми аминокислотами. Продукты этой реакции могут проявлять электрохимическую активность, отличающуюся от активности исходных аминокислот.

5. При интерпретации получаемых данных имеет смысл обсудить образование комплексов Cu^{2+} с аминокислотами, некоторые из которых катализируют рН-зависимое электровосстановление диоксида до пероксида водорода, способное исказить результаты измерений.

Вышеизложенные соображения носят частный характер, не снижают общую положительную оценку работы и не влияют на обоснованность положений диссертации, выносимых на защиту.

Апробация работы. Основные результаты отражены в 19 статьях в российских и зарубежных научных журналах, двух главах в коллективных монографиях, а также доложены на 17 российских и международных конференциях. По результатам исследований получены патенты РФ на изобретение № 2425382 «Способ экспресс-определения кардиомиоглобина в плазме крови с помощью

электрохимического иммуносенсора» и № 2585307 «Электрохимический способ экспресс-анализа комплексообразования амилоида-бета с ионами металлов». Опубликованные работы и автореферат в полной мере отражают проведенное исследование, представляют его результаты и выводы.

Тематически диссертационная работа Е.В. Супрун полностью соответствует специальности 03.01.04 — биохимия.

Результаты и выводы диссертации могут быть рекомендованы к использованию в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова (биологический и химический факультеты, Институт физико-химической биологии им. А.М. Белозерского), Казанском федеральном университете (Химический институт им. А.М. Бутлерова), Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (Институт биохимии им. А.Н. Баха), Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Первом Московском государственном медицинском университете им. И.М. Сеченова, Российском кардиологическом научно-производственном комплексе Министерства здравоохранения РФ (Институт клинической кардиологии им. А. Л. Мясникова). С учетом расширенной характеристики разработанных диссертантом медико-диагностических систем и их апробации на репрезентативных выборках биопроб возможна их дальнейшая регистрация и внедрение в практику службами клинической лабораторной диагностики Российской Федерации. Важное значение имеет также применение предложенных подходов для высокочувствительной и селективной детекции других диагностически значимых соединений белковой и пептидной природы.

Знакомство с диссертацией, авторефератом и основными работами подтверждает, что Е.В. Супрун выполнено законченное научное исследование высокого теоретического и экспериментального уровня, к докторским диссертациям по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов. Диссертация Е.В. Супрун представляет собой научно-квалификационную работу, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение — разработана и успешно применена методология селективной электрохимической

детекции белков и пептидов, регистрации их комплексообразования и структурных изменений, основанная на вольтамперометрической регистрации поверхностных электроактивных групп.

Диссертационная работа Елены Владимировны Супрун «Электрохимические биосенсорные системы для анализа клинически значимых белков и пептидов» соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении учёных степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, в редакции Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на совместном заседании лабораторий иммунобиохимии, биомедицинских исследований и химической энзимологии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук: (протокол № 4 от 13 февраля 2017 г.), основное направление научно-исследовательской деятельности которых соответствует тематике диссертации.

Заведующий лабораторией иммунобиохимии

Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН,

доктор химических наук, профессор

Дзантиев Борис Борисович



Подпись *Франциска В.Б.*
ЗАВЕРЯЕТСЯ *Мамаров*
28. февраля 2017 г.

Б.Б. Дзантиев

«28» февраля 2017 г.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, лаборатория иммунобиохимии.

Почтовый адрес: ФИЦ Биотехнологии РАН, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, 119071, Москва, Россия. Телефон: (495)954-31-42. Адрес электронной почты: dzantiev@inbi.ras.ru