

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной деятельности
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет», д.г.-м.н., профессор



Нургалиев Д.К.

2019 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Самохвалова Алексея Владимировича «Изучение взаимодействия аптамеров с охратоксином А: количественные закономерности и аналитическое применение», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 - биохимия

Актуальность темы исследования. Современный этап биоанализа характеризуется взрывным увеличением числа объектов контроля, к числу которых относятся не только метаболиты и биомаркеры заболеваний, но и загрязнители окружающей среды, способные накапливаться при переносе по пищевым цепям и в итоге оказывать негативное влияние на здоровье человека. Их действие усугубляется тем, что организм человека не всегда имеет адекватные механизмы биохимической защиты, а определение осложняется низкими концентрациями и сложной комплексной матрицей, способной повлиять на результаты определения.

На сегодняшний день иммуноанализ остается доминирующим способом определения токсинов в пищевых продуктах и окружающей среде, однако некоторые его недостатки, такие как сложности селекции антител, недостаточная устойчивость при хранении и особые условия применения, - перестают удовлетворять специалистов по пищевой безопасности. Аптамеры, синтезируемые *de novo*, являются альтернативой антителам, часто соответствуя им по аффинности и опережая по термической и химической устойчивости, возможностям модификации и включения в состав тестовых устройств. Однако эти преимущества, ставшие очевидными вскоре после появления первых аптамеров в 1990 г., в существенной мере остаются нереализованными, а число биологических мишеней, для которых известны коммерчески доступные аптамеры с достаточной аффинностью, пока несопоставимо меньше числа иммунотестов.

Вышесказанное определяет **актуальность, научную и практическую значимость** представленной работы, посвященной решению комплекса проблем, связанных с выбором аптамеров и разработкой способов определения охратоксина А (ОТА),

токсичного вторичного метаболита плесневых грибов *Aspergillus* и *Penicillium*, загрязняющего арахис, злаки и ряд других растительных продуктов. Хотя ОТА часто связывают с продуктами из арахиса, он обнаруживается в мясе животных, получающих его в кормах, и продуктах брожения (соевые соусы, рисовые вина и пр.).

Для достижения поставленной цели автором сформулированы и решены задачи, связанные со скринингом перспективных аптамеров, характеристикой особенностей структуры выбранного аптамера в свободном состоянии и в комплексе с ОТА, определением константы взаимодействия аптамера с аналитом и разработкой способа определения ОТА с помощью поляризационного флуоресцентного анализа, в том числе в сложных матрицах.

Представленный план исследования соответствует логике исследований в области биоанализа, базируется на известных из литературы закономерностях функционирования биохимических рецепторов и отражает современные тренды развития анализа на основе аптамеров.

Диссертация Самохвалова А.В. изложена на 145 страницах текста компьютерной верстки и состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы, содержащего 305 библиографических описаний работ отечественных и зарубежных авторов. Диссертация содержит 49 рисунков и 12 таблиц.

Во **Введении** обоснована актуальность проведенного исследования, сформулированы цель и задачи, положения, составляющие научную новизну и практическую значимость исследования, а также положения, выносимые на защиту. Определены личный вклад автора и достоверность полученных результатов. Приводятся сведения об апробации диссертации на конференциях различного уровня и публикациях по теме диссертации.

Глава 1 «Обзор литературы» начинается с общего описания истории развития методов получения аптамеров – протокола SELEX и его вариаций с перечислением ограничений и возможностей в плане достижения высокой аффинности продуктов к определяемому соединению. После этого приводятся современные представления о структуре связывающих участков аптамеров и конформационных изменениях, сопровождающих такие связывания. Кратко рассмотрены подходы к определению констант аффинности и преимущества биоаналитического использования аптамеров на основе ДНК и РНК.

Следующая часть литературного обзора посвящена практическому применению аптамеров как препаратов фармацевтического назначения, аналитических реагентов и пр. Автор дает краткий перечень аналитических систем в соответствии с

принципом регистрации сигнала и далее останавливается более углубленно на методе поляризационного флуоресцентного анализа, использованном в собственных исследованиях. Подробно рассмотрены теория поляризации/анизотропии флуоресценции и механизм соответствующих оптических явлений. Приведены расчеты констант диссоциации комплексов и примеры реализации поляризационного флуоресцентного анализа для конкретных аналитов.

Следующий раздел литературного обзора посвящен характеристике ОТА. Приведены нормативные предельные уровни его присутствия в продуктах питания. Описан проявляемый токсический эффект, а также аптамеры, выделенные для его определения, и примеры их использования в рамках флуоресцентного анализа.

Обзор литературы оставляет хорошее впечатление, но грешит жаргонными терминами и прямыми заимствованиями из английского языка (матрица – матрикс, контаминант). Значительная часть представленной информации, особенно исторические аспекты, познавательна, но имеет достаточно отдаленное отношение к предмету диссертационного исследования. Вместо этого хотелось бы видеть характеристики определения ОТА иными методами, например, с помощью иммуноанализа, или иными системами детектирования (электрохимические аптасенсоры). Однако в целом обзор литературы выполняет свое назначение и подтверждает большую актуальность и востребованность выбранной темы диссертационного исследования.

Глава 2 «Материалы и методы» содержит подробное описание реактивов, измерительного оборудования, протоколов проведения подготовки биохимических реагентов и измерений с их помощью. В качестве незначительного замечания можно указать на неудачный подзаголовок «мелкодисперсные наночастицы золота». Представленная информация позволяет сделать заключение о *достоверности* полученных научных результатов и их обсуждения.

Глава 3 «Результаты и обсуждение» посвящена собственным результатам Самохвалова А.В. и их обсуждению в рамках задачи выбора аптамеров и определения ОТА в сложных матрицах с помощью поляризационного аптамерного анализа.

Автором проведено сравнение в гомогенных условиях характеристик связывания четырех аптамеров к ОТА, выбранных на основе обзора литературы, и определены условия связывания ОТА по изменению флуоресценции метки-флуорофора (производное флуоресцеина). После выделения аптамера №1 как наиболее чувствительного к ОТА исследования были продолжены с помощью измерения кругового дихроизма. Сначала было установлено, что внесение концевых биотинных фрагментов

не меняло способности аптамера к формированию G4-квадруплексов. Далее было показано, что формирование квадруплексов происходит только в присутствии в среде катионов двухвалентных металлов. Анализ данных спектроскопии кругового дихроизма и литературных источников позволил заключить, что связывание ОТА аптамером происходит по концевым участкам аптамера, находящегося в конфигурации квадруплекса, так что ее устойчивость прямо влияет на аффинность взаимодействия рецептора с аналитом. Ранее высказывалось предположение, что подобное связывание сопровождается переходом линейной формы аптамера в G4-квадруплекс, однако оно подтверждения в работе не получило.

Следующим этапом стало определение констант аффинности по данным анизотропии флуоресценции. Для этого была предложена оригинальная двухстадийная схема, в которой сначала устанавливали константу связывания меченого аптамера, а затем в конкурентном эксперименте с меченой и немеченой молекулами лиганда определяли вклад конкуренции их связывания с ОТА. Необходимость в такой схеме была связана с выявленным фактом влияния связывания флуорофора на его флуоресценцию путем сравнения соответствующих спектров флуоресценции, потребовавшим внесения поправочного коэффициента в анизотропию флуоресценции на этапе определения констант аффинности. Величину 50% связывания устанавливали по логистической четырехпараметровой модели. Помимо расчетов константы, на данном этапе была проведена оценка минимальной концентрации флуорофора, позволяющей получать воспроизводимые результаты измерения. Автор приводит математический аппарат предлагаемого протокола расчета константы аффинности. Данная часть текста частично дублирует аналогичное описание в Экспериментальной части диссертации. Следовало или перенести вывод формулы в Главу 2, или сконцентрировать всю информацию в Главе 3. Измерение константы взаимодействия аптамера и немеченого лиганда проводили в тройной системе, содержащей также меченный флуорофором лиганд. Как отмечает автор, полученные значения констант не противоречат литературным данным, но большой (порядок величины) разброс найденных значений несколько снижает ценность данного раздела для дальнейшего конструирования аналитической системы.

Следующий раздел 3.3 посвящен оценке возможности регистрации взаимодействия аптамера и ОТА по изменению флуоресценции аналита, без введения флуоресцентной метки. Исследования матриц экстинкции-эмиссии позволили обнаружить пятикратное увеличение эмиссии при включении ОТА в комплекс и высказать предположение о резонансном переносе энергии с аптамера на связанный ОТА как причине

столь значительного изменения спектра. На основании проведенных исследований были выделены наиболее информативные показатели спектра для оценки связывания аналита с аптамером. Хотя в большинстве проведенных исследований использовали достаточно высокую концентрацию ОТА (100 нМ), полученные количественные характеристики позволяют получать хорошие экстраполяции зависимости доли связанного аптамера от концентрации ОТА

После установления возможности безметочного флуоресцентного анализа ОТА автором были проведены исследования, направленные на создание аналитической системы на принципах, аналогичных поляризационному флуоресцентному иммуноанализу. Для этого сначала была введена поправка на относительно небольшую массу аптамера по сравнению с антителами, а затем предложена модификация аптамера белковым «якорем». Определение ОТА было реализовано на основе конкурентного анализа с включением в состав рецепторной молекулы стрептавидина и его комплекса с иммуноглобулином G. Последний показал наибольшее увеличение чувствительности определения. Значение предела обнаружения составило 3.6 нМ, что в 40 раз ниже показателя, достигнутого с нативным аптамером. Замена белкового «якоря» на более традиционные наночастицы золота позволило незначительно снизить предел обнаружения до 2.9 нМ.

Разработанная конкурентная схема анализа была апробирована в определении ОТА в образцах вин. Пробоподготовка сводилась к обесцвечиванию вина с параллельным удалением мешающих полифенолов и добавлением солей кальция для стабилизации квадруплекса аптамера. Достигнутые значения предела обнаружения ОТА в вине согласуются со значениями, ранее полученными в буферном растворе. Вместе с тем, степень открытия ОТА достаточно сильно варьировала (83-113%). На основании проведенных экспериментов сделан вывод о возможности установления загрязнения вин ОТА на уровне его нормируемых значений.

Диссертация завершается *Заключением*, очень кратким и содержащим только выводы по работе. Они следуют из представленных экспериментальных данных, логичны и полностью отражают проведенные исследования.

Характеризуя диссертационную работу Самохвалова А.В. в целом, необходимо сделать вывод, что это законченное самостоятельное исследование, в котором автор на примере системы аптамер – ОТА развил существующие представления о механизме взаимодействия и формировании отклика (в данном случае – применительно к поляризационному флуоресцентному аптамерному анализу) аналитических систем. Используя современную методологию оптимизации структуры и условий измерения

флуоресценции, ему удалось количественно охарактеризовать взаимодействие аптамер – аналит, сделать вывод о конфигурации аптамера, оптимальной с точки зрения его связывания с ОТА, оценить возможности повышения чувствительности регистрации сигнала за счет внедрения белковых и небелковых молекулярных «якорей» и тщательного подбора других условий измерения флуоресценции.

В ходе исследования было выдвинуто и подтверждено предположение о квадруплексной структуре активной формы аптамера, взаимодействующей с ОТА, а также о резонансном переносе энергии при связывании аптамера с ОТА без флуоресцентной метки, способствующем аномальному увеличению сигнала. Работоспособность предложенной аналитической системы была подтверждена на примере установления концентрации ОТА в образцах вин. Правильность определения была установлена с помощью метода «введено – найдено». Также необходимо отметить широкое применение расчетов и моделей, позволивших автору устанавливать рабочие концентрации аналитов и соотношения реагентов, исходя из размера и формы частиц – носителей аптамера.

Работа отличается несомненной *научной новизной*. Она связана с обоснованием алгоритма определения константы диссоциации применительно к взаимодействию аптамер-ОТА по данным флуоресцентной спектроскопии. Выявлен ранее неизвестный эффект увеличения флуоресценции ОТА в комплексе с аптамером и сделано предположение о резонансном переносе энергии флуоресценции с аптамера на ОТА как причине подобного усиления отклика. Впервые предложено использовать молекулярные «якоря» (белки и наночастицы золота) для повышения чувствительности аптамерного анализа.

Практическая новизна проведенного исследования связана с разработкой способов модификации аптамера для повышения чувствительности определения ОТА и методикой оценки загрязненности вин данным токсикантом с достаточно простой пробоподготовкой, подавляющей мешающее влияние цветности и содержащихся в винах полифенолов.

Несмотря на общее положительное заключение о работе, к ней имеются замечания принципиального характера.

1. При обсуждении структуры аптамера, специфичного к ОТА, и аналитических характеристик определения ОТА с его помощью необходимо было привести сравнение предела обнаружения и интервала определяемых концентраций с параметрами других вариантов определения указанного соединения, включая данные иммуноанализа и биосенсоры на основе аптамеров (аптасенсоры). Это позволило бы оценить

вклад предлагаемых методических решений в достижение высокой чувствительности определения аналитов.

2. Хотя в начале работы упоминаются 4 структуры аптамера, все последующие эксперименты были проведены только с одним аптамером. Было бы полезно сравнить достигнутые результаты определения ОТА с другими потенциальными кандидатами (пусть не оптимальными) хотя бы для того, чтобы понять, насколько важны структурные факторы (строение аптамера) по сравнению с оптимизацией условий измерения сигнала.

3. При обсуждении собственной флуоресценции ОТА как сигнала, отражающего его связывание с аптамером, автором допускается дублирование информации в графиках и уравнениях линейных регрессий, что представляется явно избыточным (стр.95). Также текстуально дублируются фразы о соответствии предела обнаружения ОТА и норм его содержания в продуктах питания в разделах, посвященных использованию белковых «якорей» и наночастиц золота.

4. Достигнутый предел обнаружения сопоставим с нормируемыми концентрациями ОТА (1.45 мкг/кг и 0.5-10 мкг/кг, стр.106). Автор называет достигнутое значение предела обнаружения аналитически значимым. Оставляя за скобками неудачный термин, отметим, что для практического использования тест должен давать возможность измерения концентраций аналита, не менее чем в 3 раза меньших, чем его нормируемое содержание в объекте контроля.

5. Подписи к рисункам, содержащим градуировочные зависимости с интервалами ошибок должны содержать указание на число параллельных измерений. Также необходимо указать, как оценивалась повторяемость результата (какие потенциальные источники ошибок варьировали).

6. Работа бы выиграла, если бы автор в Заключение кратко изложил свое видение перспектив дальнейшего развития предложенных подходов.

Указанные замечания не меняют общей благоприятной оценки работы. Основные полученные результаты опубликованы в 10 работах, включая три статьи в рецензируемых научных журналах и 7 тезисов доклада. Публикации и автореферат полностью отражают содержание диссертации.

Результаты исследований докладывались на многих конференциях различного уровня и известны научной общественности. Исследования были поддержаны рядом российских научных грантов.

С результатами диссертационной работы следует ознакомить научные центры, работающие в области биоанализа, – Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Научный центр РАН в Черноголовке, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирск), а также ведомственные лаборатории контроля качества пищевой продукции.

Считаем, что диссертация Самохвалова А.В. «Изучение взаимодействия аптамеров с охратоксином А: количественные закономерности и аналитическое применение» удовлетворяет требованиям п.9-14 Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановление Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациями, как научно-квалификационная работа, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития методов биоанализа с применением аптамеров. Автор работы, Самохвалов Алексей Владимирович, достоин присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Отзыв рассмотрен и утвержден на заседании кафедры аналитической химии Химического института им.А.М.Бутлерова ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» 29 августа 2019 г., протокол № 1.

Отзыв составил

Заведующий кафедрой аналитической химии

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,

д.х.н., профессор



Геннадий Артурович Евтюгин

г.Казань, 420008, ул.Кремлевская, 18

тел. 8-843-2337491,

e-mail: Gennady.Evtugyn@kpfu.ru

3 сентября 2019 г.

