

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу 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**

В последние годы в биохимических исследованиях растет интерес к созданию новых систем распознавания, альтернативных антителам. Одним из перспективных классов рецепторов, альтернативных моноклональным антителам, являются аптамеры, представляющие собой короткие одноцепочечные последовательности нуклеиновых кислот. Их получение проще, дешевле и быстрее, чем получение моноклональных антител. Оценка и характеристика таких новых рецепторов является важной фундаментальной и прикладной задачей.

Особенно важны установление количественных закономерностей, характеризующих различные варианты взаимодействия лиганд-рецептор в применении к аптамерам, разработка практических приложений аптамеров. Использование аптамеров в настоящее время затруднено недостаточным количеством накопленных знаний, касающихся систематической оценки их свойств и возможностей.

В связи с этим диссертационная работа Самохвалова А.В., посвященная изучению закономерностей и количественной оценке взаимодействия аптамер – охратоксин А (ОТА), а также разработке на этой основе систем для аналитического определения ОТА в продуктах питания сложного состава, является актуальной.

Научная новизна диссертации состоит в том, что автором предложен алгоритм для характеристики взаимодействия ОТА – аптамер с помощью флуоресцентной спектроскопии с построением и детальным анализом матриц экстинкции-эмиссии. Впервые охарактеризован ранее неизвестный эффект увеличения собственной эмиссии молекул ОТА в комплексе с аптамером и показано, что в основе данного эффекта лежит перенос энергии возбуждения с аптамера на ОТА. Предложен алгоритм определения константы диссоциации методом анизотропии флуоресценции применительно к аптамер-лигандным взаимодействиям. Предложен подход для повышения чувствительности подхода, основанного на поляризации флуоресценции, за счет включения аптамера в комплексы с молекулярными якорями, в качестве которых предложены белки и наночастицы золота.

Практическая значимость диссертации состоит в том, что предложен поляризационный аптамерный анализ с усилением с использованием молекулярных якорей для определения ОТА, проведена его апробация при

тестировании проб вина, продемонстрировано, что разработанный анализ позволяет определять ОТА в вине в концентрациях ниже предельно допустимого уровня; разработаны рекомендации по созданию поляризационного аптамерного анализа с использованием молекулярных якорей, имеющие универсальный характер для применения в других системах.

Диссертационная работа изложена на 144 страницах машинописного текста, содержит 49 рисунков и 12 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и списка литературы (305 источников).

Во введении сформулированы цель и задачи исследования, обоснованы актуальность, научная новизна и практическая значимость диссертационной работы.

Глава 1 содержит обзор литературы, в котором обобщены сведения по применению рецепторов на основе нуклеиновых кислот; получению нуклеиновых кислот с заданными свойствами методом систематической эволюции лигандов путем экспоненциального обогащения (SELEX), использованию нуклеиновых кислот в качестве рецепторов и созданию на их основе аптамеров; обобщены способы определения констант, характеризующих взаимодействие аптамер – лиганд, и области практического использования аптамеров, прежде всего в анализе. Обзор литературы полно освещает текущее состояние дел в вопросах, решению которых посвящена диссертация.

В главе 2 дано подробное описание использованных в исследовании реагентов, аппаратуры, методик синтеза и проведения экспериментов. Приведенные сведения позволяют детально воспроизвести полученные результаты.

В главе 3 представлены результаты проведенных экспериментов и их обсуждение. Описан выбор ОТА-связывающих аптамеров, проведена их сравнительная характеристика, охарактеризованы связывающие свойства и структура аптамеров, специфичных к охратоксину А. Для проведения количественной оценки использованы сигналы ОТА, меченного флуоресцеином. Определены константы взаимодействия аптамер-ОТА методом анизотропии флуоресценции и методом равновесного диализа.

Приведены данные по характеристике взаимодействия аптамер-ОТА по изменению собственной флуоресценции ОТА, изучены матрицы экстинкции-эмиссии ОТА в свободном состоянии и в комплексе с аптамером, влияние концентрации аптамера и ОТА на интенсивность флуоресценции ОТА. Нужно отметить внимание автора к деталям и тонкостям проведения расчетов и количественной оценки взаимодействия.

Описан принцип молекулярных якорей, характеристики поляризационного аптамерного анализа с использованием якорей на основе

белков и наночастиц золота. Обоснованы критерии выбора оптимального якоря. Проведено Сравнение предложенных подходов для определения ОТА в пробах вина.

Полученные результаты представлены наглядно и подробно, сделанные выводы проиллюстрированы экспериментальными и литературными данными. Текст автореферата соответствует тексту диссертации.

Результаты исследований А.В. Самохвалова прошли достаточную апробацию. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в ведущих журналах по профилю диссертации и 7 тезисов конференций.

Тем не менее, имеются некоторые замечания по работе:

1. При оценке различных эффектов автор не всегда указывает количество параллельных экспериментов и доверительные интервалы. Например, «интенсивность максимума флуоресценции возрастает на 28%»; «для 30 нМ ОТА уменьшение составляет 45%, а для 10 нМ – 50%».
2. К сожалению, в работе не представлен спектр возбуждения полосы флуоресценции ОТА. Автор не совсем удачно называет испускание при коротковолновом возбуждении ОТА (262 нм) дополнительным максимумом флуоресценции. Также автором не высказано предположений о причинах и природе увеличения интенсивности эмиссии при коротковолновом возбуждении.
3. Теоретические данные рис. 35 указывают на то, что использование стрептавидина в качестве якоря позволяет достичь практически максимально возможного значения поляризации флуоресценции. Экспериментальные же данные указывают на весьма существенное увеличение поляризации при переходе от двойного комплекса аптамер-стрептавидин к тройному, с участием IgG. С чем автор связывает полученное расхождение?
4. В Заключение работы автор указывает, что «Проведена апробация разработанной поляризационной флуоресцентной аптамерной системы для детекции охратоксина А в пробах вина», однако в работе речь идет о пробах только белого вина. Для методов, основанных на оптическом способе детектирования аналитического сигнала, цвет и другие характеристики пробы могут иметь решающее значение и определять возможность/невозможность проведения анализа.
5. Незначительные замечания и комментарии:

Данные, представленные на рис. 44, вряд ли позволяют заключить, что распределение наночастиц золота по размеру «узкое».

Авторы не полностью приводят расчет теоретического количества молекул стрептавидина на одну наночастицу золота. Полученное значение 7 слишком мало, предположительно указывает на арифметическую ошибку.

Следует отметить, что работа очень тщательно продумана и отредактирована. При этом присутствуют незначительные стилистические неточности и жаргонизмы, такие как «в трисовом буфере», «флуоресцентные спектры», «перенос энергии флуоресценции».

Сделанные замечания не снижают положительную оценку диссертации. Диссертационная работа Сотникова Д.В. выполнена на современном теоретическом и экспериментальном уровне. Автореферат диссертации и публикации автора в достаточной мере отражают содержание диссертации.

По актуальности, объему исследований, новизне и практической значимости диссертационная работа Самохвалова А.В. «Изучение взаимодействия аптамеров с ократоксином А: количественные закономерности и аналитическое применение» удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук на основании «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановлений Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, от 2 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024, от 1 октября 2018 г. № 1168). Диссертационная работа содержит решение задачи, важной для развития биохимии – разработан и апробирован научно-методический аппарат для количественной характеристики взаимодействия аптамеров с лигандами, показаны возможности регистрации анизотропии флуоресценции для высокочувствительной детекции комплексообразования. Автор диссертационной работы, Алексей Владимирович Самохвалов, безусловно, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Доктор химических наук по специальности 02.00.02,
доцент, профессор кафедры общей и неорганической химии
ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский
государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Тя

Горячева Ирина Юрьевна

Адрес: г. Саратов, 410012, Астраханская 83.

Тел. 88452516959

E-mail: goryachevaiy@mail.ru

