

О Т З Ы В

на диссертационную работу **Самохвалова Алексея Владимировича** «Изучение взаимодействия аптамеров с охратоксином А: Количественные закономерности и аналитическое применение», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – "Биохимия"

Конструирование и характеристика новых рецепторных молекул на основе биополимеров – активно развивающееся направление современной биохимии. Аптамеры, короткие одноцепочечные фрагменты нуклеиновых кислот, представляют собой новый класс рецепторов, которые могут использоваться для характеристики огромного числа связываемых ими биологически значимых лигандов. Одним из востребованных лигандов является охратоксин А (ОТА) – токсичный вторичный метаболит плесневых грибов, широко представленный как контаминант сельскохозяйственных растений (ячмень, пшеница, кукуруза, овес и др.). Его присутствие контролируется законодательно на российском и международном уровне. Доминирующим методом его выявления является дорогостоящая высокоэффективная жидкостная хроматография, что обуславливает интерес к альтернативным биорецепторным методам анализа.

Вышеизложенные соображения определяют актуальность исследования А.В. Самохвалова. В выполненной им диссертационной работе проведена количественная характеристика взаимодействия аптамер-ОТА и разработан новый подход для определения ОТА с использованием аптамеров в качестве распознающих молекул. В ходе достижения поставленной цели решено шесть задач, включающих скрининг перспективных ОТА-специфичных аптамеров, характеристику особенностей их структуры и определение констант взаимодействия аптамеров с ОТА.

В диссертационной работе А.В. Самохвалова впервые:

- разработан алгоритм определения равновесной константы диссоциации комплекса аптамер – лиганд, основанный на детекции анизотропии флуоресценции с использованием лиганда (ОТА), модифицированного

флуоресцентной меткой. Сравнение кажущихся констант диссоциации, определенных предлагаемым методом и референсным методом равновесного диализа, показало близость получаемых значений.

- показано, что связывание ОТА с аптамером сопровождается резонансным переносом энергии, приводящим к увеличению собственной флуоресценции ОТА. Детально проанализированы образование комплекса ОТА-аптамер и происходящие при этом оптические изменения. Исследована зависимость модулируемой флуоресценции от концентраций ОТА и аптамера. Построение флуоресцентных матриц экстинкции – эмиссионных комплексов меченого и немеченого ОТА с аптамером подтверждает процесс связывания и позволяет охарактеризовать условия полного перехода ОТА из свободной в связанную форму. В рамках диссертационной работы обнаружен ранее не описанный эффект увеличения флуоресценции ОТА при $\lambda_{\text{экт}} = 262 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{эм}} = 432 \text{ нм}$. Это позволило предложить новый подход для определения концентрации ОТА, основанный на модуляции его флуоресценции при включении в комплекс с аптамером.

- предложен оригинальный метод усиления поляризации/анизотропии флуоресценции комплекса аптамер-лиганд, основанный на использовании молекулярных якорей: включение аптамеров в комплексы с высокомолекулярными соединениями. Данный процесс вызывает снижение подвижности метки и рост её поляризации флуоресценции. Предсказанный эффект подтвержден теоретическими расчетами, которые показали, что оптимальным белковым якорем будет белок с массой от 150 кДа и более. Продemonстрировано применение предложенного принципа для снижения предела обнаружения ОТА с использованием в качестве якорей стрептавидина (53 кДа) и комплекса стрептавидин-IgG (203 кДа). Также экспериментально продемонстрировано, что в качестве якорей можно использовать наночастицы золота, имеющие жесткую структуру и высокую плотность. Полученные конкурентные зависимости для анализа с использованием якорей показали снижение предела обнаружения ОТА до 50 раз.

Практическая востребованность работы определяется установленной возможностью использования ДНК-аптамеров для анализа токсичных веществ в

равновесного диализа. На основании установленных закономерностей предложен ряд новых подходов для количественного детектирования ОТА с использованием аптамерного рецептора.

Эксперименты проведены на высоком научно-методическом уровне, заключения по их результатам подтверждены соответствующим статистическим инструментарием.

Работа в целом логична, четко структурирована и написана хорошим литературным языком. Тем не менее, имеется несколько вопросов по представленному материалу:

1. Из текста диссертации неясно, можно ли было ввести метку по 3'-концу аптамера и могло ли это усилить эффективность связывания.

2. Некоторые методические особенности проведенных экспериментов не конкретизированы. Так, концентрации реагентов в экспериментах, результаты которых даны на рис. 23, не отражены в методической части. Не приведены измерения концентраций используемых аптамеров в оптических единицах при 260 нм, подтверждающие реальные концентрации вещества в пробирке.

Отмеченные недочеты частного характера не снижают хорошего впечатления от работы и не влияют на обоснованность сделанных выводов и значимость полученных результатов.

Диссертация А.В. Самохвалова «Изучение взаимодействия аптамеров с охратоксином А: Количественные закономерности и аналитическое применение» по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов является законченной работой высокого уровня. Диссертационная работа 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). В работе решена задача, важная для развития биохимии, – проведена количественная характеристика взаимодействия аптамеров в охратоксином А и предложены новые методы анализа, основанные на

использовании данного вида рецепторов. Автор диссертационной работы, Алексей Владимирович Самохвалов, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Старший научный сотрудник
НИИ физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова,
доцент, доктор биологических наук
(специальности - 03.01.02 - Биофизика,
03.01.03 – Молекулярная биология)

18.09.2019

Спиридонова Вера Алексеевна

Адрес: г. Москва, 119234, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 40.
Тел. (495) 9393196
E-mail: spiridon@belozersky.msu.ru

