

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических Бодулева Олега Леонидовича
на тему: «Методы количественного определения микроРНК с
применением хемилюминесцентной детекции»
по специальности 1.5.6. Биотехнология**

В настоящее время установлена перспективность микроРНК как маркеров различных заболеваний человека. В связи с этим решаются две задачи – «прямая» - установление взаимосвязи уровней экспрессии определенных миРНК в конкретных типах тканей или биологических жидкостей на различных стадиях развития заболеваний и «обратная» - определение концентрации микроРНК в образцах конкретного пациента с диагностической целью. Решение обеих задач требует разработки методов количественного анализа миРНК, предназначенных для их определения в биообразцах. В связи с этим разработка новых методов количественного определения миРНК является практически значимой актуальной задачей. Соответственно, **цель работы**, состоящая в разработке новых высокочувствительных и высокоспецифичных методов количественного определения миРНК с хемилюминесцентной детекцией, как безамплификационных, так и с применением амплификационной реакции каталитической сборки шпилек является актуальной.

Для достижения поставленной цели автором обоснован и разработан гомогенный безамплификационный подход, оптимизированы условия проведения гомогенного хемилюминесцентного определения миРНК-141, основанного на аллостерической активации ппДНКзима; выработана стратегия гетерогенного определения миРНК с использованием тройной амплификации с применением бесферментной амплификационной реакции каталитической сборки шпилек, конъюгата стрептавидин-полипероксидаза и

усиленной хемилюминесценции, апробированная при определении миРНК-141, миРНК-155 и миРНК-39; разработаны варианты протекания реакции каталитической сборки шпилек, «КСШ с высвобождением олигонуклеотида» (КСШВО), проведено сравнение эффективности разработанного и традиционных вариантов на примере определения миРНК-155; разработанные подходы протестированы на примере определения миРНК-141 и миРНК-155 в раковых клетках человека.

Все исследования проведены диссертантом впервые, указанные ключевые результаты составляют **научную новизну работы**. Разработанные подходы к снижению предела обнаружения определения миРНК, их применимость анализу реальных объектов линии клеток (HepG2, Caco2, MCF7 и HeLa), применимость для оценки экспрессии миРНК в клетках и тканях с использованием стандартных микропланшетов и ридеров, установленная зависимость фоновой реакции нКСШ от условий отжига шпилечных зондов и оптимизация данного этапа с улучшением аналитических параметров определения миРНК определяют **практическую значимость** выполненной работы.

На **защиту автор выносит**: простое, быстрое и точное количественное определение миРНК и каталитически активной экзонуклеазы III на основе применения аллостерической активации пероксидазы подобного ДНКзима; разработанную стратегию гетерогенного определения миРНК с помощью тройной амплификации, конъюгата стрептавидин-полипероксидаза и усиленной хемилюминесценции, улучшение аналитических параметров за счет тщательной оптимизации условий отжига шпилечных зондов, а также разработку бесферментной амплификационной реакции и

Положения, выносимые на защиту, обоснованы, достоверность полученных результатов подтверждается непротиворечием современным литературным данным, широкой апробацией результатов, использованием самых современных методов исследования и передовых лабораторных практик.

Научные выводы работы обобщают проведенные исследования и их результаты и отражают вклад работы в российскую и мировую науку.

Работа состоит из введения, обзора литературы, включающего три главы, посвященные описанию структуры и биохимических функций микро-РНК, анализу существующих методов детекции микро-РНК и описанию методов амплификации нуклеиновых кислот в анализе микро-РНК, главы, посвященной описанию материалов и методов, результатов и обсуждения (2 главы), заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Главы с результатами описывают разработку аналитических методов с применением аллостерической активации пДНКзима и определение микроРНК-155 и микроРНК-39, основанные на реакции каталитическая сборки шпилек с некомплементарным противостоянием нуклеотидов.

Диссертация соответствует направлениям специальности 1.5.6. Биотехнология.

Работа изложена на 107 страницах машинописного текста, содержит 5 таблиц и 44 рисунка, список литературы включает более двухсот ссылок. Хочется отметить внимательное отношение автора к оформлению работы, как текста, так и рисунков. Текст автореферата соответствует тексту диссертации.

По диссертации имеются следующие **вопросы и пожелания**.

1. Автор указывает, «что сформулированные в диссертационной работе подходы имеют универсальный характер и могут быть применены не только в анализе различных миРНК, но также и других РНК- и ДНК-олигонуклеотидов.», при этом не очерчивает границы их применимости как по характеристикам потенциально определяемых олигонуклеотидов, так и объектов анализа. Возможно, имело бы смысл более подробно обсудить достоинства и недостатки разработанных аналитических подходов.
2. При определении оптимальных концентрации гемина и зонда по зависимости хемилюминесцентного сигнала в реакционной среде в

методе детекции микроРНК-141 основанном на аллостерической активации ппДНКзима (рис 11) авторы не получили колоколообразную зависимость интенсивности, а лишь указали, что «дальнейшее повышение концентрации гемина в реакционной среде приводило к увеличению фонового сигнала (данные не показаны).» В таком случае имело смысл привести не интенсивность, а отношение сигнал/шум, например.

3. Небольшие замечания:

В литобзоре указано, что «Показано, что уровни экспрессии миРНК влияют на скорость роста опухоли и помогают выбрать эффективную стратегию терапевтического лечения пациентов [5].» В самой статье говорится не столько о влиянии миРНК на скорость роста опухоли, сколько о потенциальной роли прогностических биомаркеров у пациентов с различными карциномами.

Сложно согласиться с фразой «Существенным затруднением применения на практике электрохимических методов является то, что они не предназначены для массовых (скрининговых) анализов [26].»

Говоря о Ферстеровском резонансном переносе энергии правильнее говорить не донор переноса, а донор энергии.

Указанные пожелания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.6. Биотехнология (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук,

на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Бодулев Олег Леонидович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

Доктор химических наук,
Директор Института химии
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Горячева Ирина Юрьевна

Контактные данные:

тел.: 7(9[REDACTED]), e-mail: g[REDACTED]@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

02.00.02 – Аналитическая химия

Адрес места работы:

410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д.83, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» Тел.: +7 (8452) 51 - 69 - 60; e-mail: inchem@info.sgu.ru