

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

Актуальность избранной темы. Изучение микроРНК оптимально именно в настоящее время, так как важность и актуальность данной тематики уже ни у кого в мире не вызывает сомнения, но в то же время работы здесь остается непочатый край. *Количественное* определение микроРНК актуально вдвойне, так как практически ни одно исследование объектов данного класса не может обойтись без высокочувствительной аналитики – ни фундаментально-, ни медицински-ориентированное. Несмотря на востребованность методов анализа микроРНК, высокочувствительного и в то же время по-настоящему удобного флуоресцентного метода до настоящего исследования не было. Таким образом, представленная диссертация Олега Леонидовича Бодулева и актуальна и своевременна.

Новизна. Диссертант разработал безамплификационный метод определения микроРНК, основанный на принципе аллостерической активации ДНКзима, с конечной детекцией, применяющей хемилюминесценцию, что позволило достичь поставленной цели – высокой конечной чувствительности анализа. Тоже с применением хемилюминесценции, но на сей раз усиленной, диссертант предложил гетерогенный анализ с тройной амплификацией и бесферментной изотермической реакцией. Выявил влияние условий отжига шпилечных зондов реакции нКСШ на интенсивность фоновой реакции метода определения микроРНК, основанного на реакции нКСШ; предложил новый бесферментный метод амплификации с высвобождением олигонуклеотида;

показал, что оптимизация данного этапа способна улучшить аналитические параметры определения микроРНК.

Степень обоснованности положений, выносимых на защиту, научных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Все пять формальных выводов, сформулированных диссертантом, основаны на хорошо продуманных и воспроизводимых экспериментах, логически вытекают из полученных результатов, четко сформулированы. Исследования проводились с использованием надежных методов молекулярной биологии, физической и аналитической химии, в частности, это были методы иммобилизации олигонуклеотидов на твердом носителе с применением антител; отжиг и гибридизация; электрофорез в ПАА-геле; спектроскопия кругового дихроизма; хемиллюминесценция; ковалентное биоконъюгирование антител с магнитными частицами. Полученные результаты не заканчиваются их констатацией – диссертант делает предположения о том, как они могут быть дальше использованы в развитии данной тематики в плане аналитики и медицинских приложений.

На защиту выносятся положения, которые кратко можно сформулировать следующим образом:

- аллостерическая активации ппДНКзима дала отличные результаты при анализе микроРНК и активности экзонуклеазы III;
- для количественного определения микроРНК объединение внутри одной стратегии идеи тройной амплификации с идеей бесферментной амплификационной реакции нКСШ, в сочетании с усилением сигнала полипероксидазой и хемиллюминесценцией, дает ощутимый выигрыш в чувствительности и специфичности, и открывает дальнейшие возможности развития гетерогенных методов определения микроРНК;
- оптимизация условий отжига шпилечных зондов помогает понизить аналитический фон методов;

- эффективность анализа по пути бесферментной амплификационной реакции КСШВО дает эффективность эквивалентную нКСШ.

Все приведенные выше положения имеют под собой надежный, не вызывающий возражений или сомнений экспериментальный фундамент.

Особо нужно отметить то, как проводились оптимизации условий анализа микроРНК, столь необходимые в аналитических разработках. Это делалось обоснованно, с объяснением логики выбора тех или иных условий и интервалов оптимизации, я бы сказал, делалось красиво; особенно в разделе про ионы металлов и отжиг.

Впечатляют результаты по специфичности разработанного анализа. Так, при тестировании микроРНК-141 и ее пяти структурно близких аналогов, принадлежащих к тому же семейству (то есть, гомологичных), разработанный метод анализа обнаруживает только микроРНК-141 и микроРНК-200а перекрестная реактивность с которой (ее последовательность отличается от микроРНК-141 на два нуклеотида) составляет менее 20%, в то время как с остальными микроРНК перекреста не было вовсе.

Отметим также то, что высокие показатели специфичности и чувствительности разработанного метода сохраняются при переходе от работы в «стерильных условиях» к клеточным лизатам.

Обзор литературы покрывает область исследования (около 160 ссылок) и написан с высокой степенью полноты и с оптимальной степенью детализации, хорошим языком, дружелюбно иллюстрирован, помогает читать и понимать экспериментальный материал представленной работы; важно, что в Обзоре критически сравниваются и оцениваются существующие методы. Обзор в его финальной части имеет убедительное подведение итогов всей проведенной литературной работы.

Замечания.

1. Список сокращений неполный, неалфавитный, содержит несколько кириллических вариантов там, где общеупотребимыми являются латиничные сокращения, например, «ППР – поверхностный плазмонный резонанс» вместо канонического хорошо узнаваемого SPR, или ФРПЭ вместо FRET.
2. Методики не всегда прописаны достаточно подробно, то есть в протокольной моде, что затруднит впоследствии их воспроизведение. Например, фраза «после чего они инкубировались с 20 мМ сульфо-N-гидроксисукцинимидом и 40 мМ ЭДК» не дает читателю понять, проводились инкубации последовательно или одновременно. В целом, Экспериментальная часть занимает неполных 6 страниц диссертации, что само по себе говорит о недостаточной детализации методик.
3. Часто используется термин «фон», но далеко не всегда из контекста можно понять, что конкретно имеется в виду в данном случае. Хотя справедливости ради нужно заметить, что при подаче экспериментальных данных, как правило, термин «фон» разъясняется.
4. На рисунке 13 использован красный крест, неочевидный смысл которого не объяснен.
5. Рисунок 14 выполнен без любви к читателю: на первый взгляд изображенные там окружности и вертикальные прямые состоят из точек, и лишь после 10-кратного увеличения картинка становится видно, что «точки» - это с трудом различимые буквы А, С, G, Т.
6. Смысл рисунка 20 непонятен: на нем изображены две совершенно одинаковые структуры, названные как Ш1-Флу(141) и Ш2-Био(141).
7. Неидеален язык изложения: есть орфографические ошибки (например, «бардовый»), синтаксические (приводящие к ситуации «казнить нельзя помиловать»); есть тексты, которые из-за невыверенного языка можно понять неправильно, например, «Дуплекс был мечен флуоресцеином

для взаимодействия с анФлуАт-МЧ и биотином для взаимодействия с проявляющим конъюгатом. Проведена реакция исследуемых конъюгатов...» понимается так, что мечение производил сам диссертант, хотя на самом деле - фирма Синтол; есть неудачные выражения («сужает спектр миРНК», «в широком спектре растений», «показана зависимость фоновой реакции нКСШ от условий отжига шпилечных зонда метода») и фразы с элементом мечтательности, как эта: «...может быть легко использован в условиях любой лаборатории...».

8. В диссертации есть раздел Заключение, написание которого несколько разочаровывает, так как оно представляет собой скорее повторение Выводов, чем сравнение между собой разработанных аналитических методов и рассуждения о дальнейшем развитии данного направления.
9. В разделе «Практическая и теоретическая значимость работы» есть злоупотребление модальным глаголом «может», который в нашем языке дает читателю свободу выбрать между «это в принципе возможно» и «это уже сделано».

Приведенные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание Автореферата соответствует таковому самой диссертации. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.6. Биотехнология (по химическим наукам).

Представленная работа несомненно соответствует 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, профессор
Главный научный сотрудник,
руководитель лаборатории углеводов
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт
биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

БОВИН Николай Владимирович

0.6.12.23 подпись

Дата подписания

Контактные данные:

тел.: +7() , e-mail: p()@yandex.ru
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
02.00.10 – биоорганическая химия

Адрес места работы:

117997, Бовин Н.В., г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10,
Государственный Научный Центр Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.
Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, отдел
химической биологии гликанов и липидов, лаборатория углеводов,
Тел.: +7 (495) 335-01-00 (канцелярия); e-mail: office@ibch.ru

Подпись сотрудника Государственного Научного Центра Федеральное государственное бюджетное учреж
Шемякина и Ю.А.

органической химии им. академиков М.М.
й академии наук, Н.В.Бовина удостоверяю:

Ученый секретарь
доктор физ.-мат. н.

_____ дата

07.12.2023 г.