

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 неуклонно растет спрос на простые, экспрессные методы тестирования широкого круга маркеров различных социально-значимых заболеваний непосредственно у постели больного или в обычных биохимических лабораториях, не требующих дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала. Развитие этих подходов позволяет оказывать своевременную медицинскую помощь значительно большему количеству больных, в более короткие сроки, а также снижает нагрузку на здравоохранение во всем мире. Новый класс молекул, называемых микроРНК, относительно недавно привлек внимание органов здравоохранения из-за их потенциала в качестве биомаркеров заболеваний человека. При этом также пришлось столкнуться с тем, что большинство аналитических методов, основанных на нозерн-блоттинге, гибридизации *in situ*, ПЦР с обратной транскрипцией, секвенировании нового поколения, все еще далеки от их использования в качестве идеальных инструментов диагностики. Длительное время анализа, опыт, необходимый, необходимый для подготовки образцов, недостаточная миниатюризация делает их подходящими платформами только для централизованных лабораторий в мегаполисах. Кроме того, по-прежнему остаются в ряде случаев такие проблемы, как недостаточная чувствительность разрабатываемых методик анализа, селективность, воспроизводимость и т.д. Развитие новых подходов к определению указанных молекул, разработка новых альтернативных способов амплификации сигнала, в том числе изотермической амплификации, является актуальной задачей биотехнологии, химического анализа, медицинской диагностики.

В связи с этим *цель диссертационной работы* Бодулева О.Л., направленная на разработку новых высокочувствительных и высокоспецифичных методов количественного определения микроРНК с хемилюминесцентной детекцией, как безамплификационных, так и с применением амплификационной реакции каталитической сборки шпилек является актуальной и практически значимой.

Для достижения цели работы поставлены следующие задачи: Оценка возможности и перспектив применения ппДНКзима для определения миРНК. Оптимизация условий проведения, определение и оценка аналитических характеристик гомогенного хемилюминесцентного метода определения миРНК-141, основанного на применении ппДНКзима.

Выработка стратегии гетерогенного определения миРНК с использованием тройной амплификации, основанной на применении бесферментной амплификационной реакции КСШ, конъюгата стрептавидин-полипероксидаза и усиленной хемилюминесценции. Разработка и оптимизация условий проведения, определение и оценка аналитических характеристик методов анализа миРНК-141, миРНК-155 и миРНК-39 (используется в качестве внешнего стандарта при анализе в биоматериалах человека), сконструированных на основе предложенной стратегии.

Разработка модифицированной реакции КСШ, в процессе протекания которой происходит накопление ДНК олигонуклеотида, «КСШ с высвобождением олигонуклеотида» (КСШВО). Сравнение эффективности КСШВО и нКСШ в анализе миРНК-155.

Тестирование разработанных методов определения миРНК-141 и миРНК-155 для их количественного анализа в раковых клетках человека.

Положения, выносимые на защиту, обоснованы, достоверность полученных результатов подтверждается литературными сведениями за последние двадцать лет, апробацией результатов, использованием современных методов исследования и передовых лабораторных практик. Научная новизна работы заключается в разработке гомогенного

безамплификационного метода определения миРНК-141, основанного на аллостерической активации пДНКзима с хемилюминесцентной детекцией, а также разработке методики определения ферментативной активности экзонуклеазы III на базе указанной платформы; разработке стратегии гетерогенного определения миРНК с использованием тройной амплификации, основанной на использовании бесферментной изотермической реакции нКСШ, конъюгата стрептавидин-полипероксидаза и усиленной хемилюминесценции. На основе указанной стратегии развиты методы количественного определения миРНК-141, миРНК-155 и миРНК-39, впоследствии успешно примененные для анализа миРНК в лизатах культивируемых клеток человека (HepG2, Caco2, MCF7 и HeLa). Сравнение разработанных гетерогенных методов определения миРНК с применением микропланшета и магнитных частиц выявило преимущества планшетного формата анализа. Обнаружено влияние условий отжига шпилечных зондов реакции нКСШ (концентрации NaCl/MgCl₂ и шпилечного зонда в среде его отжига) на интенсивность фоновой реакции метода определения миРНК, основанного на реакции нКСШ. Предложен и апробирован в анализе миРНК-155 новый бесферментный метод амплификации, названный «КСШ с высвобождением олигонуклеотида» (КСШВО).

Научные выводы работы обобщают проведенные автором исследования и отражают вклад работы в современную науку. Главный вывод из работы целиком отражает основную цель проведенного исследования.

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, главы, посвященной описанию материалов и методов, результатов и обсуждения (две главы), заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация соответствует направлениям специальности 1.5.6. Биотехнология.

Работа изложена на 107 страницах машинописного текста, содержит 44 рисунка и 5 таблиц, список литературы включает более двухсот ссылок, включая ссылки на работы 2023 года. Работа легко читается, в ней фактически отсутствуют опечатки, качественно оформлены таблицы и рисунки, список литературы. Текст автореферата отражает текст диссертации.

По диссертации имеются следующие вопросы и пожелания:

1. Следует отметить, что автор в рамках диссертационного исследования постоянно обращает внимание на повышение чувствительности анализа, снижение пределов обнаружения, его селективности, при этом в диссертации недостаточно сведений о воспроизводимости анализа, например от перехода инкубации зонда с аналитом в течение 1 часа до 18 часов или как влияет использование тройной амплификации сигнала на повторяемость результатов.
2. В ряде случаев в работе отсутствуют сведения, которые были бы информативны для понимания результатов исследований. Например, «дальнейшее повышение концентрации гемина в реакционной среде приводило к увеличению фонового сигнала (данные не показаны)» или «увеличение концентрации приводит к повышению интенсивности сигнала, после чего сигнал начинает снижаться при концентрации частиц выше 2.3×10^9 частиц/мл. Причины данного явления нами не исследовались. Однако это может быть связано с агрегацией МЧ в растворах с высокой концентрацией. В то же время мы полагаем, что при использовании МЧ с иными агрегатными характеристиками значение оптимальной концентрации может отличаться от найденного нами». Доказать укрупнение частиц не требует сложного эксперимента.
3. Есть небольшие погрешности в терминологии при изложении литературных данных и результатов эксперимента «донор переноса» лучше заменить на донор энергии при описании Ферстеровского

резонансного переноса энергии, вместо «слабого наклона» пользоваться термином коэффициент чувствительности.

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, профессор кафедры аналитической химии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Веселова Ирина Анатольевна

4.12.2023

Контактные данные: тел.: +7  e-mail: VeselovaIA@my.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация: 02.00.02 – Аналитическая химия

Адрес места работы: 199991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 3,
ГСП-2, Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, химический факультет Тел.: +7 (495) 939-16-71; e-
mail: dekanat@chem.msu.ru