

Отзыв официального оппонента

о диссертации Гарафутдинова Равиля Ринатовича
"Молекулярные основы новых амплификационно-
опосредованных методов анализа нуклеиновых
кислот", представленной на соискание учёной
степени доктора химических по специальности 1.5.4
- биохимия (химические науки)

Диссертационная работа посвящена разработке новых подходов к анализу нуклеиновых кислот на основе методов амплификации при использовании в качестве объектов сложных систем, например, характерных для криминалистической практики, анализа палео-ДНК. Амплификация как метод диагностики в медицине, исходная стадия при установлении видовой и родовой принадлежности живых организмов в настоящее время стала уже классическим, рутинным подходом. Совершенствование аппаратного оформления, ассортимента реактивов существенно расширяют область применения амплификации в направлении анализа "неудобных" систем, содержащих целевые короткие нуклеотидные последовательности в присутствии большого избытка сторонней ДНК. Подобные системы характерны для древней ДНК, захороненной в осадочных породах, также для так называемой "ДНК окружающей среды", выделяемой из природных вод, которые содержат остатки фекалий и смывов с тел гидробионтов. Данные образцы содержат фрагменты разрушенной ДНК многих организмов. Определение ДНК открыло большие возможности для криминалистики, и здесь также часто приходится иметь дело с малым количеством исследуемой ДНК, ассоциированной с другими материалами. Даже выделение ДНК из ряда живых организмов представляет собой нетривиальную задачу, подразумевающую предварительное диспергирование материала и использование специальных реагентов для разрушения комплексов ДНК с другими биополимерами. В итоге исследователям часто приходится иметь дело с короткими фрагментами ДНК, вовлечение которых в реакцию амплификации в её классическом варианте может привести как к ложно-отрицательным, так и к ложно-положительным результатам.

Таким образом, разработка новых подходов к анализу короткоцепочечных нуклеиновых кислот является актуальной темой, развитие которой совершенно необходимо для корректного использования амплификационных методов в

сложных системах, где вероятна деструкция ДНК. В работе Р. Р. Гарафутдинова рассмотрен ряд принципиальных аспектов в данной области:

- закономерности расщепления ДНК под влиянием механических воздействий, включая действие ультразвука. Подобные воздействия происходят в том числе при выделении ДНК из различных объектов и работе с ней. Установлены преимущественные сайты расщепления ДНК под действием ультразвука, а также влияние метилирования остатков цитозина на эффективность фрагментации. Полученные результаты явились основой для конструирования праймеров для амплификации деструктурированной ДНК;
- использование сближенных праймеров для ПЦР. Показаны их преимущества, особенно при анализе образцов разрушенной ДНК, заключающиеся в снижении продолжительности реакции и повышении её чувствительности. Особое внимание уделено возможным осложнениям при применении сближенных праймеров, в частности, к накоплению продуктов их димеризации даже в отсутствие целевого участка нуклеиновой кислоты, что следует учитывать при конструировании праймеров;
- детально исследован процесс мультимеризации ДНК, получены новые экспериментальные данные о механизме этой реакции. Полученные знания применены для выработки стратегии предотвращения нежелательной мультимеризации, а также для её аналитического использования в определённых случаях, например, для анализа РНК коронавируса SARS-CoV-2;
- разработан оригинальный вариант конвекционной амплификации, не требующий термоциклирования, оценены области его применимости;
- оценено влияние ряда добавок на протекание амплификации нуклеиновых кислот: углеводов, полиаспарагиновой кислоты, двузарядных ионов металлов, заменяющих кофактор - ион магния.

В качестве несомненного достоинства данной работы следует отметить органичную связь фундаментальных исследований в области амплификации и практических задач. Необходимость в разработке новых методов и подходов вытекала из практических задач, а полученные знания использовались при решении других задач. Использованные в работе объекты, помимо синтетических олигонуклеотидов (366 штук), включают генетический материал пчёл и медоносных растений, коронавируса SARS-CoV-2, хвойных растений (ель, сосна, лиственница), дуба и липы, богомола обыкновенного, фага Лямбда, микроРНК, человека. Помимо материала из отдельных организмов,

использованы смеси биоматериалов, содержащие целевые нуклеотидные последовательности в минорном количестве и деструктурированном состоянии: почва, древесная труха, мед, клеточные лизаты. В случае всех сложных смесей речь шла о конкретной практической или фундаментальной задаче, при успешном решении которой разрабатывались новые методы и подходы к анализу на основе реакции амплификации.

Диссертационная работа построена по классической форме, содержит 3 главы, посвящённые обзору литературы, описанию методик экспериментов и обсуждению результатов, изложена на 321 странице, включая 52 таблицы, 86 рисунков и список литературы из 660 наименований.

Литературный обзор занимает 50 страниц и разделён на три части, первая из которых посвящена описанию амплификации нуклеиновых кислот. Далее рассматриваются особенности ключевых компонентов амплификационных систем и проблемные аспекты амплификационного анализа. Литературный обзор достаточно полный и критичный, основан, преимущественно, на англоязычных источниках. В качестве замечания по данному разделу можно отметить:

1. В дополнение к описанию существующего уровня науки и проблем в литературном обзоре, было бы полезно перед каждым разделом обсуждения результатов помещать краткую (порядка 1 стр.) справку/резюме для лучшего понимания места работ автора в мировой науке.

Во втором разделе представлено детальное описание использованных материалов и методов. В то же время к этой части работы имеются вопросы и замечания:

2. При описании использованных реактивов (стр. 65) следует не ограничиваться общими названиями и указанием фирмы-поставщика, а предоставлять существенную информацию о составе, чистоте, методах очистки. Например, в случае поливинилпирролидона важна его молекулярная масса, многие неорганические соли существуют в безводном виде или в форме кристаллогидратов, некоторые органические растворители (диметилсульфоксид, этиловый спирт, ацетон) часто нуждаются в анализе и очистке даже при поставке от проверенного поставщика.

3. При описании определения концентрации нуклеиновых кислот (стр. 89) следует указывать не только использованные спектрофотометры, но и более существенные характеристики – длину волны и экстинкцию.

4. Выделение ДНК из мёда (стр. 90) проводится путём растворения мёда в воде, отделения осадка и дальнейшей работы только с этим осадком. На чём основана уверенность в отсутствии ДНК в надосадочной жидкости, возможно в виде стабилизированных наночастиц?

5. Описание разрушения ДНК под действием ультразвука и/или ультрафиолета (стр. 93) содержит недостаточно данных для воспроизведения экспериментов с использованием другого оборудования. В случае ультразвука существенным является его частота, объём водяной бани, температура бани. Для облучения УФ светом желательно представлять спектр излучения, а также указать, каким образом измерена интенсивность излучения в месте нахождения образца.

6. В ряде случаев, например, при проведении препаративного гель-электрофореза (стр. 100) используется собственная методика и методика, основанная на коммерческом наборе реагентов. При этом в первом случае методика хорошо описывается, а во втором просто называется фирма – производитель набора. Возникают вопросы – чем собственная методика отличается от фирменной? Какая и в каких случаях лучше?

Следующий раздел работы посвящён результатам и их обсуждению. По данному разделу имеются следующие замечания:

7. При обсуждении влияния длины ДНК на её фрагментацию (разд. 3.1.1., стр. 107) сделан вывод о минимальном размере фрагментов более 100 п.о., хотя на рис. 3.3. для ДНК-1029 видны фрагменты существенно короче 200 п.о., при этом маркер в области 100 п.о. отсутствует. Также в случае рис. 3.5. обсуждается область 2000-2500 п.о., в то время как маркеров выше 1000 п.о. нет.

8. В случае обсуждения влияния ингибиторов на ПЦР (разд. 3.2.3., стр. 127) показано, что ПЦР-ингибирующие соединения препятствуют проведению реакции с "классическими" праймерами, в отличие от сближенных праймеров. При этом проблема ингибирования снимается использованием коммерческого набора для выделения ДНК. В этой связи возникает вопрос – в чём преимущество от использования сближенных праймеров в данном случае? Не проще ли использовать метод, дающий чистую ДНК и возможность получения длинных продуктов ПЦР, пригодных для последующего секвенирования и молекулярно-генетических исследований?

9. При рассмотрении механизма мультимеризации (с. 154) показано достоверное влияние марки буфера (Thermopol, Isothermal и Taq-ME) на скорость и специфичность реакции. Есть ли предположения, хотя бы на уровне

гипотез, о причинах влияния природы буфера? Может, дело в разной ионной силе буферных растворов?

10. Проведено моделирование структуры фермент-субстратного комплекса с участием катионов различных металлов (стр. 184). Вопрос – в случае ионов магния расчёт такой системы проведён впервые или его можно сопоставить с известными литературными данными?

11. При тестировании новых праймеров для определения половой принадлежности биоматериалов человека (раздел 3.5.1.4., стр. 205) использовали ли генетический материал ХУ-женщин?

12. В разделе 3.6.1. установлено влияние добавок углеводов на протекание ПЦР. Есть ли предположения о механизме этого влияния?

13. Раздел 3.6.2. содержит описание программы для подбора LAMP-праймеров. На мой взгляд, при этом следовало рассмотреть алгоритм работы программы, а не только её интерфейс.

14. Как отмечено на стр. 43, в обзоре литературы, известно, что динуклеотид 5'-CG-3' в наибольшей степени подвержен разрушению. Мне кажется необходимым уточнить, что новое сделано автором в этой области, важность и актуальность этих данных, про которые говорится в 1-м, самом важном, выводе по работе.

15. Основная часть работы посвящена использованию сближенных праймеров в различных вариантах ПЦР. Целесообразно представить соображения о месте этого подхода среди методов анализа, основанных на ПЦР. В частности, представляется, что "классические" праймеры, обеспечивающие наработку протяженных последовательностей между участками отжига праймеров имеют явное преимущество при популяционном анализе, поиске замен и т.п.

В целом, работа выполнена на высоком экспериментальном и теоретическом уровне, результаты не вызывают сомнений, что обусловливается использованием необходимого комплекса современных методов в области анализа нуклеотидных последовательностей, включая дизайн, синтез и химическую модификацию олигонуклеотидов, гель-электрофореза, ВЭЖХ, клонирование, выделение ДНК из природных источников различными методами, различные варианты амплификации, секвенирование, применение и разработку современного программного обеспечения. Все основные работы выполнены автором или под его непосредственным руководством.

Диссертация и автореферат написаны хорошим языком, практически не содержат опечаток. Можно лишь отметить отдельные неточности в названиях буферов, например, Thermopol вместо Thermopol-C.

В результате проведённых исследований решена актуальная научная проблема – разработан комплекс подходов для анализа сложных смесей нуклеиновых кислот, практически всегда встречающихся при проведении экспертиз, анализе древней ДНК, экологических исследованиях. В работе на примере множества модельных и реальных систем продемонстрирована эффективность использования сближенных праймеров, обеспечивающих высокую эффективность и избирательность ПЦР. Сильной стороной работы является критическое отношение к предлагаемым методикам, во всех случаях анализируются области применимости сближенных праймеров, указываются возможные артефакты.

Результаты диссертационной работы найдут применение в различных областях, требующих определения нуклеотидных последовательностей: экспертиза, включая криминалистическую; анализ палео-ДНК и сложных смесей, например, почвы; определение следовых количеств ДНК. Преимуществом методов, развиваемых автором, является стремление к возможной минимизации аппаратного оформления и повышению экспрессности, что необходимо для выполнения массовых исследований в "полевых" условиях, например, в эпидемиологической практике.

Отмеченные выше недостатки носят частный характер и не затрагивают существа защищаемых положений. Результаты диссертационного исследования достаточно полно отражены в 41 статье, 22 из которых индексируются базами данных WoS/Scopus. Новизна выполненных работ подтверждена 4-мя защищенными РИД: патентами на изобретение, полезную модель и свидетельствами о регистрации программ для ЭВМ. Автореферат в полной степени отражает содержание диссертационной работы.

Таким образом, представленная на соискание ученой степени доктора химических наук диссертация Гарафутдинова Рауиля Ринатовича «Молекулярные основы новых амплификационно-опосредованных методов анализа нуклеиновых кислот», выполнена на высоком научном уровне и является завершённой научно-квалификационной работой, совокупность результатов которой может быть охарактеризована как существенный вклад в такую область биохимии как амплификация нуклеиновых кислот и её

использование в аналитических целях. Диссертационная работа по объему, качеству выполнения, актуальности полученных результатов полностью соответствует требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертационная работа оформлена в соответствии с Положениями о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор, Гарафутдинов Равиль Ринатович заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4. - биохимия.

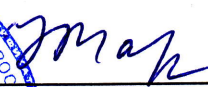
Заместитель директора по науке
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Лимнологического института Сибирского
отделения Российской академии наук
(ЛИН СО РАН), д.х.н., профессор

 В. В. Анненков
17.02.2025

664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел. +7-9148982577
e-mail: annenkov@lin.irk.ru
Вадим Владимирович Анненков

Подпись Анненкова Вадима
Владимировича заверяю,
Учёный секретарь ЛИН СО РАН, к.б.н.



 Н. В. Максимова