

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Филипенко Максима Леонидовича на диссертацию Гарафутдинова Равиля Ринатовича "Молекулярные основы новых амплификационно-опосредованных методов анализа нуклеиновых кислот", представленной на соискание учёной степени доктора химических наук по специальности 1.5.4 - биохимия (химические науки)

Актуальность исследования

С момента появления метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) началась новая эпоха в молекулярной биологии и генетике. Методы амплификации нуклеиновых кислот открыли новые возможности для изучения объектов живой природы, дав мощный толчок развитию генетических технологий и исследований в области геномики. Не менее важным является их вклад в развитие молекулярной диагностики различных заболеваний. В настоящее время амплификационно-опосредованный анализ нуклеиновых кислот стал рутинной практикой, однако продолжается совершенствование существующих подходов и разработка новых технологий с целью обеспечения высокой скорости, специфичности и чувствительности такого анализа. ПЦР является "золотым стандартом" и остается наиболее используемым методом амплификации нуклеиновых кислот. С момента разработки этого метода было предложено множество вариантов данной реакции. Значительное развитие получили методы изотермической амплификации, принципиально отличающейся от ПЦР и способной обеспечить решение ряда нетривиальных задач. Диссертационная работа Гарафутдинова Р.Р. посвящена изучению отдельных свойств ключевых компонентов амплификационных систем и поиску на основе полученных данных новых, более чувствительных и специфичных способов анализа "сложных" НК-мишеней, что, несомненно, является актуальной задачей, требующей дальнейшего развития в данной области.

Общая характеристика и содержание диссертации

Диссертация Гарафутдинова Р.Р. написана в традиционной форме. Она содержит введение, обзор литературы (глава 1), описание использованных в работе методов исследования (глава 2), результатов и их обсуждение (глава 3), выводы, список цитируемой литературы и приложение. Диссертационная работа изложена на 321 странице, включает 52 таблицы, 86 рисунков и список литературы из 660 наименований.

Обзор литературы, занимающий 50 страниц, поделен на три подраздела, в которых рассматриваются наиболее популярные методы амплификации нуклеиновых кислот,

описание особенностей ключевых компонентов амплификационных систем и отдельные проблемные аспекты амплификационного анализа. В главе 2 детально описаны материалы и экспериментальные методы, в том числе перечислены базы данных и программное обеспечение. Здесь приведены последовательности всех использованных в работе праймеров и олигонуклеотидных ДНК-матриц. В главе 3, занимающей 142 страницы, изложены и обсуждены результаты исследований. Данная глава содержит 6 подразделов. В первых четырех подразделах собраны результаты фундаментального характера, а именно, получены данные о влиянии ряда факторов на характер механической фрагментации ДНК, о протекании ПЦР со сближенными праймерами, о неспецифической изотермической амплификации ДНК в ходе т.н. реакции мультимеризации. В двух последних подразделах демонстрируются примеры использования полученных данных фундаментального характера для решения практических задач. Выводы обобщают полученные результаты и полностью подтверждаются приведенными данными. В целом, диссертация написана хорошим языком, практически не содержит опечаток. Автореферат соответствует основному тексту диссертации.

Научная новизна и практическая значимость результатов

Научная новизна результатов исследования связана с получением с помощью современных методов приоритетных данных о процессах, происходящих при фрагментации нуклеиновых кислот под действием механических сил, обусловленных протеканием неспецифического ДНК-синтеза в ходе амплификации, об особенностях взаимодействия ключевых молекулярных компонентов – ДНК-матриц и полимераз, в амплификационных системах. Гарафутдиновым Р.Р. впервые изучена фрагментация ДНК под действием ультразвука на модели ДНК-ампликонов, с помощью количественной ПЦР показано влияние среды, первичной структуры ДНК, статуса метилирования на характер расщепления. Детально изучена реакция мультимеризации ДНК, предложены способы ее предотвращения. Полученные данные фундаментального характера были использованы диссертантом при решении практических задач. Так, на основании предпочтительности использования в ПЦР сближенных праймеров предложено несколько подходов к анализу НК-мишеней, включающих использование ультразвукового облучения. Показана применимость мультимеризации для обнаружения РНК-мишеней. Предложен принципиально новый способ оценки статуса метилирования ДНК.

Результаты работы не только способствуют более глубокому пониманию процессов, происходящих при фрагментации нуклеиновых кислот под действием механических сил и связанных с протеканием неспецифического ДНК-синтеза, но также могут использоваться

при проведении амплификационных экспериментов. Они могут найти применение в различных областях, требующих обнаружения специфических нуклеотидных последовательностей: в молекулярной диагностике заболеваний, при экспертной оценке образцов биологического происхождения, при анализе ДНК из сложных смесей. Полученные результаты могут также быть использованы для разработки новых методов, обеспечивающих миниатюризацию аналитических систем (биосенсоры, микрофлюидные устройства) и/или повышение скорости и производительности анализа, что востребовано, например, при проведении "полевых" исследований или в эпидемиологической практике.

Достоверность и обоснованность результатов

Достоверность результатов обусловлена применением современных методов исследования, включавших как чисто экспериментальные (выделение и амплификация нуклеиновых кислот, гель-электрофоретический анализ, клонирование, секвенирование), так и расчетные (молекулярное моделирование и докинг). В работе использовано значительное количество синтетических олигонуклеотидов, что связано с разнообразием объектов исследования. Образцы ДНК и РНК были представлены генетическим материалом хвойных растений, дуба, липы, медоносных растений, пчёл, человека, богомола обыкновенного, коронавируса SARS-CoV-2, фага Лямбда, мягкой пшеницы. В целом, работа выполнена на высоком экспериментальном и теоретическом уровне. Основные результаты исследований опубликованы в 22 статьях в авторитетных международных и российских изданиях, получено 4 патента на изобретение, полезную модель и свидетельства о регистрации программ для ЭВМ. Результаты исследований не вызывают сомнений.

Замечания

В целом диссертационная работа производит хорошее впечатление. Исследование выполнено на высоком методическом уровне, сформулированные в работе выводы базируются на обширном экспериментальном материале.

Существенных замечаний по существу работы нет. Но хотелось бы задать автору работы следующие вопросы:

1. Сравнение эффективности праймеров для LAMP, подобранных с помощью разных программ, в том числе LAMPprimers iQ проведено только на одной мишени без градиента температуры реакции, в то время как подбор температуры может значительно повлиять на эффективность LAMP. Были ли еще попытки исследования возможности дизайна эффективных LAMP систем для других мишеней?

2. Продуктивной представляется экспериментальная проверка предположения о более эффективном связывании Bst-полимеразы с пурин-богатыми нуклеотидными последовательностями, сделанного на основании молекулярного моделирования. Возможно, это позволило бы углубить понимание механизма мультимеризации, уточнить предложенную модель этого процесса и повысить эффективность мультимеризации как метода выявления нуклеиновых кислот.
3. Новые подходы на основе мультимеризации, предложенные для детекции специфических нуклеиновых кислот, требуют дополнительной проверки на большем количестве мишеней для достижения и подтверждения аналитической специфичности и чувствительности, сравнимых с классическими методами, в том числе ПЦР и LAMP. Есть ли у автора такие данные, будет ли эта работа продолжаться и в каком направлении?

Заключение

На основе всего вышеизложенного можно сделать вывод, что диссертационная работа Гарафутдинова Равиля Ринатовича "Молекулярные основы новых амплификационно-опосредованных методов анализа нуклеиновых кислот" является цельным завершенным научным исследованием, полностью соответствует требованиям и критериям, установленным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора химических наук, а сам Гарафутдинов Равиль Ринатович, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4 - биохимия (химические науки).

д.б.н. заведующий лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г Новосибирск

Филипенко Максим Леонидович



«13» февраля 2025

Адрес: ИХБФМ СО РАН, проспект акад.Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090 E-mail: mlfilipenko@gmail.com

Подпись д.б.н., М.Л. Филипенко, заверяю, ученый секретарь ИХБФМ СО РАН
Логашенко Е.Б.

