

Отзыв официального оппонента
на диссертационную работу Давыдовой Анны Сергеевны
**«НОВЫЕ МОНО- И БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА
ОСНОВЕ 2'-F-МОДИФИЦИРОВАННЫХ РНК-АПТАМЕРОВ
ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕМОГЛОБИНА»**,

представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по
специальности 1.4.9 – биоорганическая химия

Диссертационная работа Давыдовой Анны Сергеевны посвящена вопросам получения новых моно- и бифункциональных конструкций на основе 2'-F-пиримидин-модифицированных РНК-аптамеров и исследованию возможности создания систем для оптической детекции белковых биомаркеров на их основе. В качестве таких белковых биомаркеров были выбраны суммарный и гликированный гемоглобины. Название работы в полной мере отражает область проведенных исследований. Речь идет о **решении** задачи, связанной с конструированием бифункциональных аптамеров, способных, с одной стороны, селективно связывать молекулы гемоглобина (общего и/или гликированного), с другой стороны, способных связывать фотопротеин – обелин, а также о демонстрации принципиальной возможности создания систем люминесцентной детекции гемоглобина на их основе.

Аптамеры достаточно хорошо описаны в современной литературе, однако их широкое применение в современной диагностике по-прежнему требует ряда научных и научно-технических решений. Поскольку к одной и той же молекуле-мишени могут подходить аптамеры различного типа, поиск наиболее предпочтительного для конкретных диагностических целей является весьма важной и трудоёмкой задачей.

В связи с вышеизложенным **актуальность** настоящей диссертационной работы, посвященной исследованию возможности создания новых систем детекции на основе устойчивых в биологических средах 2'-F-пиримидин-модифицированных РНК-аптамеров для количественного определения белковых биомаркеров на примере суммарного и гликированного гемоглобинов, не вызывает сомнений.

Диссертация А.С. Давыдовой изложена на 142 страницах и состоит из Списка используемых сокращений (2 стр.), Введения (5 стр.), Обзора литературы (43 стр.), Экспериментальной части, названной «Материалы и методы» (12 стр.), главы «Результаты и обсуждение» (49 стр.), Заключение (2 стр.), Выводов (1 стр.), Списка публикаций по теме диссертации (1 стр.), Списка цитируемой литературы из 200 наименований (16 стр.) и Приложений (6 стр.).

Во **введении** автор обосновывает актуальность темы исследования, даёт информацию о степени разработанности этой темы, обозначает цель и задачи

диссертационной работы, формулирует научную новизну, практическую значимость работы, методологию и методы диссертационного исследования и выносимые на защиту положения, приводит информацию о своём личном вкладе в работу, степени достоверности и апробации результатов проведённого исследования, структуре диссертации.

В **обзоре литературы** диссертации, озаглавленном «АПТАМЕРЫ КАК УЗНАЮЩИЕ ЭЛЕМЕНТЫ БИОСЕНСОРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БИОМАРКЕРОВ», обобщены и систематизированы данные по получению аптамеров, их химической модификации и практическому применению. Так, пп.1.1-1.4 описывают общее положение дел, знакомят читателя с методами получения аптамеров (метод SELEX), химической модификации аптамеров и их практическому применению. Данные разделы логически заканчиваются таблицей, в которой приведены существующие на настоящий момент примеры детекции биомаркеров различных заболеваний с помощью колориметрических аптасенсоров. Следующая и основная часть обзора литературы посвящена именно методам конструирования аптасенсоров для детекции биомаркеров различных заболеваний, таких как онкологические, нейродегенеративные, стресс-опосредованные, воспалительные, сердечно-сосудистые и сахарный диабет.

Обзор литературы заканчивается заключением, в котором весьма четко и логично изложена вытекающая из обзора литературы нерешённая научная проблема, на решение которой и направлена данная диссертационная работа.

В **экспериментальной части** диссертационной работы, названной «Материалы и методы», приводятся общие сведения об исходных соединениях и оборудовании, используемых в диссертационной работе. Методики всех проведенных экспериментов описаны подробно и не вызывают никаких сомнений.

В главе «**результаты и обсуждение**», озаглавленной «СОЗДАНИЕ НОВЫХ 2'-F-МОДИФИЦИРОВАННЫХ РНК-АПТАМЕРОВ И АНАЛИТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ НА ИХ ОСНОВЕ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА», проанализированы и грамотно систематизированы данные, полученные автором в результате проведённых исследований. Эта глава состоит из четырех разделов, каждый из которых делится на несколько подразделов. Первый раздел посвящён получению комбинированной 2'-F-РНК-библиотеки для селекции *in vitro*. Второй раздел логически продолжает повествование и посвящён получению аптамеров, связывающих суммарный и/или гликилированный гемоглобин. Предметом обсуждения третьего раздела является получение устойчивых в биологических средах РНК-аптамеров, связывающих фотопротейн – обелин. Наконец, четвёртый, заключительный раздел, являясь апогеем данного научного исследования, посвящен созданию бифункциональных конструкций на основе аптамеров для детекции гемоглобина человека.

Обсуждение результатов проведено на очень высоком научном уровне с привлечением данных всех необходимых физико-химических методов исследований.

Обоснованность и достоверность результатов и выводов диссертационной работы А.С. Давыдовой не вызывают сомнений. Они подтверждаются системным подходом к получению целевых аптамеров, в том числе укороченных, и анализу полученных результатов с помощью комплекса современных методов исследования. Экспериментально полученные различными методами результаты коррелируют между собой. Использование современных научных представлений по рассматриваемой проблеме и согласованность результатов, полученных автором, с данными литературы также обеспечивают достоверность и обоснованность научных положений и выводов, выносимых на защиту.

Работа прошла необходимую апробацию. Её основной результат опубликован в 6 статьях в рецензируемых журналах и представлен на 5 научных конференциях, а также был обобщён в настоящей диссертации.

Отмечу, что новизна и обоснованность выводов, сформированных в диссертации, не вызывает сомнений. Они подкреплены множественными взаимно пересекающимися данными.

Таким образом, все требования, предъявляемые к кандидатским диссертациям, выполнены в полном объеме. Автореферат диссертации также в полной мере отражает содержание диссертации. У меня нет ни одного замечания по формальным моментам работы. В целом, работа оставила о себе очень хорошие впечатления.

В качестве замечаний по работе могу обратить внимание лишь на следующее:

1. В разделе 3.2.5. (стр. 98), посвященном исследованию возможности применения полученных 2'-F-РНК-аптамеров в составе сэндвич-системы для колориметрической детекции суммарного гемоглобина, диссертант использует 3 типа аптамеров, а именно H5t1, H9t1 и gH8t. Автор проверил 3 из 9 возможных комбинации данных аптамеров и после неудачных экспериментов отказался от данного типа системы, объясняя неспецифические сигналы возможным формированием комплексов между двумя аптамерами – компонентами сэндвич-пары. Вероятно, образование комплексов между двумя разными аптамерами имеет место быть, однако возникает вопрос: а если использовать в качестве обоих компонентов сэндвич-пары один и тот же аптамер, то будут ли образовываться такие комплексы, отвечающие за неспецифический сигнал? Тем более, при этом сама конструкция упростится за счёт использования лишь одного типа аптамера.

2. В разделе 3.4. (стр. 113) диссертант описывает дизайн бифункциональных конструкций на основе аптамеров O79t1, специфичному к

обелину, и H9t11, имеющему сродство к суммарному гемоглобину. При прочтении данного раздела возник вопрос в выборе пары аптамеров. Если в случае с O79t1 всё понятно, то в другом случае не очевиден выбор именно аптамера H9t11. На стр. 88 диссертации написано: «...для аптамера H9t1, укорочение которого до 43 (H9t11) ... приводило к снижению интенсивности биолюминесцентного сигнала в 2.4 раз ... (рис. 25). Полученные данные позволили заключить, что двуцепочечные участки в составе аптамеров ... H9t1 необходимы для формирования пространственной структуры аптамеров, обеспечивающей связывание с белком-мишенью.» Таким образом, аптамер H9t11 должен иметь бóльшую константу диссоциации аптамер-гемоглобин (данное значение K_d , к сожалению, не представлено в диссертации) и, соответственно, менее перспективен для использования в бифункциональной конструкции, чем тот же H9t1. Хотелось бы услышать комментарии по выбору именно H9t11 среди других перспективных аптамеров H5, H9 и gH8 семейства.

3. Несмотря на то, что данная диссертационная работа написана прекрасным русским языком, в тексте периодически встречаются некоторые опечатки и неточности. Вот некоторые из них:

- стр. 18, автор перечисляет аптасенсоры с оптическими типами детекции, среди которых разделены флуоресцентный и люминесцентный. Флуоресценция – частный случай люминесценции, поэтому их разделение не имеет смысла;
- стр. 37, слово «полидиаллилдиметиламмонийхлорид» необходимо писать раздельно – «полидиаллилдиметиламмоний хлорид»;
- стр. 53, автор упоминает «турбОдиметрический иммунохимический анализ». Вероятно, речь шла о «турбИдиметрическом иммунохимическом анализе»;
- стр. 63, 64, автор в реакционную смесь добавлял 7 мкл 1%-ного раствора ВР в 8 М мочеvine. Вероятно, речь шла о 8 М растворе мочевины, но не указано в каком растворителе. В воде? Буфере? ДМФА?
- не дана расшифровка реактива «полиА», остается лишь догадываться что это такое, полиаденозин? полиакрилат? или еще что-то?;
- стр. 7-8 а-реф., подпись к рисунку 3 начинается на стр. 7, а заканчивается на стр. 8;
- кроме того, хотел бы обратить внимание на термин «биолюминесценция», используемый при описании люминесцентного сигнала от обелина. Данный термин, по определению, означает люминесценцию в живых организмах. У меня возникают сомнения в правильности его использования, когда речь идет о процессах, протекающих *in vitro* для конкретных процессов и молекул. На мой взгляд, наиболее уместен термин «хемилюминесценция». Тем более, биолюминесценция является частным случаем хемилюминесценции.

Сделанные замечания ни в коей мере не подвергают сомнению научные выводы, сделанные соискателем. Обсуждаемая работа – цельное и законченное в рамках сформулированных задач научное исследование, результаты которого описаны обстоятельно.

Таким образом, по актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа А.С. Давыдова отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к кандидатским диссертациям. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.4.9 – биоорганическая химия (химические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а ее автор Давыдова Анна Сергеевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Заведующий лабораторией биоактивных неорганических соединений, ведущий научный сотрудник ФГБУН Института неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН

Доктор химических наук

Шестопалов Михаил Александрович

15 июня 2021 г.

630090, Новосибирск, пр-кт Акад. Лаврентьева, 3

Тел. +7 (383) 316-56-39; e-mail: shtopy@niic.ncs.ru

Я согласен на обработку моих персональных данных.

