

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Епанчинцевой Анны Валерьевны «Взаимодействие олигонуклеотидов и сферических наночастиц золота в составе нековалентных ассоциатов», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия»

Актуальность исследования

Наночастицы золота (НЧЗ), их конъюгаты и нековалентные комплексы с биологически активными молекулами с успехом применяются в биомедицинской химии и диагностике. Активные исследования НЧЗ ведутся, как минимум, с 70-х годов; стимулом послужила серия работ по конъюгатам с антителами: было показано, что наночастицы открывают принципиально новые возможности в иммунохимии. С тех пор сфера практического применения наночастиц неуклонно расширяется. Уникальные оптические свойства обуславливают их применимость в разработке сенсоров. Биосовместимость, сравнительная простота получения и функционализации НЧЗ для иммобилизации активных молекул и их последующей доставки в клетки определяют перспективность НЧЗ как доставщиков терапевтических агентов. На сегодняшний день уже несколько препаратов на основе НЧЗ проходят клинические испытания.

Особый интерес представляют комплексы НЧЗ с нуклеиновыми кислотами (НК). Ввиду выявленной роли малых РНК в геномной регуляции и бурного развития технологий геномного редактирования, проблема эффективной адресной доставки НК в клетки значима как никогда. Конъюгацию НЧЗ с белковыми молекулами можно считать в той или иной степени отработанной - эта тематика оказалась в центре внимания исследователей одной из первых. В области комплексообразования нуклеиновых кислот с наночастицами множество вопросов по-прежнему открыто. Об этом наглядно свидетельствует представленный в диссертации обзор литературы. Фундаментальные вопросы молекулярных механизмов формирования нековалентных ассоциатов и проблемы практического применения, связанные с масштабированием процесса получения ассоциатов, их хранением, контролируемым высвобождением НК и др., не были прежде рассмотрены достаточно полно. Это обуславливает **высокую актуальность** цели и задач исследования, выполненного Епанчинцевой А.В. В частности, относительно механизмов сорбции НК на поверхности НЧЗ и влияния последовательности НК на эффективность сорбции в литературе приводятся крайне противоречивые данные, что можно отнести за счет отсутствия стандартизации условий и использования разнообразных методов анализа. Епанчинцевой А.В. проделана колоссальная работа по систематизации и сравнительному анализу разноплановых исследований. Выявленные противоречия и «белые пятна» демонстрируют значимость и своевременность диссертационной работы Епанчинцевой А.В.

Научная новизна, достоверность и значимость результатов

Новизна работы определяется тем, что было впервые проведено комплексное исследование ассоциации серии НК-фрагментов с НЧЗ в контролируемых условиях и с применением универсального предложенного и отработанного автором метода. Это позволило установить влияние целого ряда факторов (последовательность НК, температура и др.) на эффективность сорбции и предложить оптимальные условия для нековалентной фиксации НК на поверхности НЧЗ. Практическая значимость данного результата, а также выявленных закономерностей высвобождения НК из состава ассоциатов и скорости их деградации в имитирующей цитозоль среде, неоспорима. Они являются основанием для выработки общих методологических рекомендаций, их необходимо учитывать при прогнозировании фармакодинамики препаратов на

основе комплексов НЧЗ-НК. Также большой интерес представляют результаты выполненной Епанчинцевой А.В. селекции аптамеров к НЧЗ и сам протокол селекции. Помимо очевидной **практической значимости**, они дополняют имеющиеся **фундаментальную ценность** результаты анализа закономерностей ассоциации. На основании полученных данных были описаны вероятные механизмы сорбции структурированных и неструктурированных НК различного состава – достаточно нетривиальные и учитывающие концентрационные эффекты.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Все ключевые результаты подтверждены несколькими надежными физико-химическими методами. Выводы базируются на обширном экспериментальном материале. Протоколы экспериментов достаточно подробно описаны в соответствующем разделе диссертации.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа А.В. Епанчинцевой построена традиционно; состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, списков сокращений и терминов, а также списка использованной литературы; изложена на 194 страницах печатного текста; содержит 22 таблицы и 64 рисунка (в нумерации допущена ошибка – номер “63” дублируется). В разделе “Введение” сформулированы цель и задачи работы, обоснована актуальность, резюмированы новизна, значимость и методология исследования. Задачи соответствуют общей цели работы. Положения, выносимые на защиту, отражают суть работы и ключевые выводы. В обзоре литературы основное внимание уделяется фундаментальным аспектам – особенностям сорбции НК на поверхности наночастиц. Рассмотрено несколько теорий. Показано, что не одна из них не претендует на универсальность. Проанализированы возможные причины противоречий в литературных данных. Применение ассоциатов НЧЗ-НК рассмотрено в обзоре более тезисно, на конкретных примерах. Этот подраздел носит скорее иллюстративный характер, т.е. дополняет обоснование актуальности работы, раскрывает его несколько более подробно – в объеме, достаточном для оценки практической значимости полученных диссертанткой результатов.

Глава “Результаты и обсуждение” содержит 4 подраздела (вынуждена отметить сбой в их нумерации). Первый посвящен разработке и оптимизации оригинального протокола получения и анализа нековалентных ассоциатов НЧЗ-НК, анализ основан на электрофоретическом методе. Во втором подразделе приведены результаты исследования закономерностей ассоциации НК (природных и модифицированных, преимущественно неструктурированных) и ряда других биомолекул с НЧЗ, количественная оценка влияния различных факторов на эффективность ассоциации, а также обсуждение вероятных “режимов” связывания. Третий подраздел посвящен селекции высокоаффинных к НЧЗ олигонуклеотидов, выведению мотива наиболее аффинных НК-фрагментов на основании встречаемости отдельных k-нуклеотидных остатков в пуле отобранных олигонуклеотидов. Учтена вероятность формирования отобранными олигонуклеотидами вторичных структур, в том числе неканонических. Сделаны предположения о паттернах связывания этих вторичных структур. В последнем подразделе рассмотрены аспекты, наиболее значимые для применения НЧЗ как доставщиков терапевтических агентов рибоолигонуклеотидной природы (вопросы хранения ассоциатов, высвобождения НК и их деградации в биологических средах). В модельной системе показана функциональность НК при их доставке в составе НЧЗ. Раздел “Выводы” содержит оценку научной и практической значимости результатов, подводятся итоги работы. Все выводы представляются обоснованными, подкреплены экспериментальными данными и теоретическим материалом. Список цитируемой литературы включает 410 источников. Основное содержание диссертации полностью отражено в автореферате. Автореферат проиллюстрирован 14 рисунками и содержит 5 таблиц. По материалам работы опубликовано 6 статей.

Замечания

1) Обсуждая результаты электрофоретического анализа ассоциации НЧЗ с НК, Анна Валерьевна не комментирует тот факт, что большинство ассоциатов визуализировано в геле в виде двух полос. Наиболее отчетливо наличие двух полос видно на Рис. 37. Нижняя полоса (ассоциат максимальной подвижности, R_f^{\max}) – достаточно четкая, по ней определяли “концентрацию насыщения”. Полоса с R_f около 80% от R_f^{\max} – более диффузная. Соответствующие ей ассоциаты характеризуются более низкой “концентрацией насыщения”.

На мой взгляд, наличие двух типов ассоциатов вполне объясняет схема, предложенная диссертанткой при анализе влияния длины олигонуклеотидов на связывание с НЧЗ (Рис. 43), и тезис, выдвинутый при обсуждении эффектов фосфорилгуанидино-вставок в НК (стр. 92). В случае достаточно длинных олигонуклеотидов (например, 26-меров) при достижении первой пороговой концентрации (около 6 мкМ для С26 и 4 мкМ для Т26, А26; Рис 27) формируются ассоциаты первого типа. Не исключено, что в них реализуются множественные контакты олигонуклеотида с поверхностью НЧЗ (вероятно, через тринуклеотидные остатки, как предполагает диссертантка), фрагменты между ними выпетлены, как показано для Т40 на Рис. 43. В таком случае большая часть отрицательно заряженной НК ‘обвивает’ НЧЗ, малая часть экспонирована в раствор. Суммарный заряд и электрофоретическая подвижность – не максимальны. Удельная нагрузка также не максимальная. При дальнейшем увеличении концентрации НК и достижении второго порогового значения (около 8 мкМ для С26 и 6 мкМ для Т26, А26; Рис 27) формируются ассоциаты второго типа (с максимальной форетической подвижностью, R_f^{\max}). Каждый олигонуклеотид предположительно контактирует с НЧЗ одним тринуклеотидным фрагментом, как показано на Рис. 43 для Т26. Такая схема действительно допускает более высокую удельную нагрузку, чем в ассоциатах первого типа, большой суммарный заряд и форетическую подвижность.

В общих чертах вышеописанные закономерности отражены в промежуточных выводах на стр. 110: “концентрация НЧЗ и НК при инкубации влияет на режим их связывания: более высокие концентрации НЧЗ и НК увеличивают загрузку НЧЗ, но уменьшают аффинность НК”. В тексте этот вывод желательно было бы пояснить применительно к двум типам ассоциатов, видимым в геле.

2) В промежуточных выводах на стр. 99 указано, что максимальная подвижность ассоциатов НЧЗ-НК не зависит от длины и состава НК. Также на стр. 91 обсуждается ‘идентичный профиль подвижности’ ассоциатов НЧЗ с длинными и короткими НК одинакового нуклеотидного состава, дана ссылка на Рис. 35. На этом рисунке для каждого типа ассоциатов приведен скан отдельного геля. Аналогично на всех прочих рисунках. Для более четкого сопоставления подвижности разных ассоциатов желательно было бы показать их на одном геле, либо использовать идентичный маркер (контрольный ассоциат) на разных гелях.

3) В подразделе 4.6.3 обсуждается влияние концентрации, длины и заряда одноцепочечных НК на эффективность ассоциации с НЧЗ. На стр. 90 упоминается несколько наборов модельных НК, в частности НК-аналоги, образованные гексануклеотидными фрагментами, соединенными гибким линкером. Они характеризуются той же концентрацией насыщения, что и олиготимидилаты, но полосы в геле выглядят менее диффузными, нет полосы меньшей подвижности. По-видимому, в случае гибких НК реализуется только один тип ассоциатов. Комментарий о влиянии гибкости НК-аналогов на ассоциацию с НЧЗ был бы не лишним в диссертации, раз уж выполнены такие эксперименты.

