

## **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 темы выполненной работы**

Работа Епанчинцевой А.В. посвящена детальному исследованию закономерностей нековалентного взаимодействия сферических наночастиц золота с нуклеиновыми кислотами и анализу стабильности их нековалентных ассоциатов в различных средах.

Одной из наиболее актуальных проблем современной фундаментальной медицины является разработка транспортных систем для терапевтических нуклеиновых кислот, способных регулировать экспрессию генов, и сенсоров для выявления широкого круга мишеней (нуклеиновых кислот, токсинов, лекарственных препаратов, наркотиков и др.) с низким пределом чувствительности. Благодаря своим физико-химическим свойствам наночастицы золота являются универсальным носителем нуклеиновых кислот и используются для создания сенсоров и систем внутриклеточной доставки. Однако, до сих пор нет доказанной модели связывания наночастиц золота с нуклеиновыми кислотами и практически не изучены нековалентные взаимодействия наночастиц золота с нуклеиновыми кислотами в низкосолевых условиях, чему и посвящена диссертационная работа Епанчинцевой А.В. Таким образом, актуальность работы Епанчинцевой А.В. не вызывает сомнений.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа Епанчинцевой А.В. построена по традиционной схеме и состоит из введения, трех глав, содержащих обзор литературы, экспериментальную часть, результаты собственных исследований с их обсуждением, выводов и списка литературы. Работа изложена на 194 страницах машинописного текста, содержит 63 рисунка, 22 таблицы и список цитируемой литературы из 410 источников.

Во введении автор формулирует цели и задачи своей работы, обосновывает актуальность исследования, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов, формулирует положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы посвящен взаимодействию золотой поверхности с различными соединениями. Автором рассмотрены сферические наночастицы золота диаметром 10 -20

нм, описаны некоторые варианты функционализации плоской поверхности золота в форме золотых пленок и электродов. В обзоре рассмотрены все основные варианты ковалентной модификации золотой поверхности, а также вопросы ковалентного и нековалентного взаимодействия белков и нуклеиновых кислот с наночастицами золота. Особое внимание уделено обсуждению возможных механизмов нековалентного взаимодействия НЧЗ с НК и описанию применения нековалентных ассоциатов НЧЗ и НК. Обзор отражает современные представления о предмете исследования и свидетельствует о высокой квалификации автора.

В Главе 2, содержащей материалы и методы, подробно описаны научно-методологические подходы, примененные автором для решения поставленных задач и достижения цели исследования. В исследовании используется широкий спектр современных биохимических и молекулярно-биологических методов. Все методики, использованные и оптимизированные в исследовании, детально прописаны и пояснены, что предоставляет возможность для воспроизведения экспериментов по приведенным протоколам.

Глава 3 посвящена изложению и обсуждению способа создания нековалентных ассоциатов наночастиц золота и олигонуклеотидов, обеспечивающего высокую стабильность олигонуклеотидного покрытия и его контролируемую загрузку на поверхность наночастиц золота в зависимости от длины и последовательности. Показано, что GTA-богатые неструктурированные олигонуклеотиды проявляют повышенную аффинность к наночастицам золота.

Автором разработан метод оценки сродства нуклеиновых кислот к наночастицам золота методом электрофоретического разделения в агарозном геле. Показана возможность декорирования нековалентных ассоциатов наночастиц и нуклеиновых кислот белками или полиэтиленгликолем с целью повышения их стабильности для применения в биологических средах. Предложен механизм взаимодействия олигонуклеотидов с наночастицами золота, заключающийся на первом этапе в связывании конформационно подвижных азотистых оснований в структуре олигонуклеотида с наночастицами и на втором этапе с формированием множественных гидрофобных контактов между олигонуклеотидом и поверхностью наночастиц золота. Показана возможность доставки siРНК с помощью наночастиц золота в составе нековалентных ассоциатов внутрь клетки и подавления экспрессии гена на примере гена GFP.

Достоверность полученных результатов подтверждается статистической обработкой данных с использованием корректно подобранных критериев и тестов. Выводы основываются на фактически полученном автором материале и отражают суть проведенного экспериментального исследования. Автор выносит на защиту семь научных положений, логично вытекающих из анализа результатов исследования и в достаточной степени аргументированные полученными результатами. Обоснованность научных положений и выводов, таким образом, не вызывает сомнений. Материал, представленный в диссертации, получен и проанализирован автором исследования лично.

### **Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов**

Научная новизна работы заключается в разработке способа получения нековалентных ассоциатов наночастиц золота и олигонуклеотидов, как одноцепочечных, так и двуцепочечных, и способа декорирования ассоциатов слоями белков, полиэтиленгликоля или липидов для повышения стабильности в биологических средах. Автором предложен способ быстрой оценки сродства олигонуклеотидов к наночастицам золота путем проведения электрофоретического разделения их ассоциатов в агарозном геле. Впервые автором проведен анализ высокопроизводительного секвенирования пула ДНК-последовательностей, отобранных в процессе селекции *in vitro* к наночастицам золота.

Научно-практическая значимость работы заключается в разработке эффективной системы доставки терапевтических нуклеиновых кислот в эукариотические клетки.

### **Достоверность и обоснованность результатов исследований**

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием широкого спектра современных биохимических и молекулярно-биологических методов исследований, детальным анализом полученных данных и корректными способами статистической обработки.

Результаты диссертационной работы опубликованы в шести рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, и доложены на пяти всероссийских и международных научных форумах и конференциях.

Следует отметить некоторые недостатки и замечания, которые возникают при тщательном изучении работы. Это очень большой объем самой рукописи и избыток представленных данных – 194 страницы, включающей 43 рисунка и 22 таблицы, в том числе и 63 страницы, посвященные обзору литературы. Также встречается некоторое количество опечаток и неудачных выражений. Один из вопросов, возникший при изучении диссертационной работы, имеет отношение к биологическому действию siРНК в

составе нековалентных ассоциатов с наночастицами золота. Так, при исследовании биологического действия siРНК в составе ассоциатов с наночастицами золота, декорированными липидами и пептидами, автор выбрал в качестве контроля siРНК в комплексе с Lipofectamine 3000. Однако, необходим также контроль, где siРНК в составе ассоциатов с наночастицами золота находится в комплексе с Lipofectamine 3000. Это позволило бы сравнить эффективность подавления гена GFP под действием siРНК в составе ассоциатов с наночастицами золота, декорированных липидами и пептидами, и siРНК в составе ассоциатов с наночастицами золота в комплексе с Lipofectamine 3000, поскольку они бы несли одинаковое количество молекул siРНК. В случае же контроля siРНК с Lipofectamine 3000 автор имеет дело с существенно меньшим количеством siРНК.

Сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не снижают научной ценности полученных результатов и сделанных выводов и ни в коей мере не умаляют хорошего впечатления от работы.

### **Заключение**

В целом, работа Епанцинцевой А.В. является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой решена задача разработки способа получения нековалентных ассоциатов наночастиц золота и олигонуклеотидов, как одноцепочечных, так и двуцепочечных, и способа декорирования ассоциатов слоями белков, полиэтиленгликоля или липидов для повышения стабильности в биологических средах, для получения систем эффективной доставки терапевтических нуклеиновых кислот в эукариотические клетки.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации, оформлен в соответствии с требованиями, установленными «Положением о присуждении ученых степеней».

Таким образом, по актуальности, научной новизне, теоритической и практической значимости диссертационная работа Епанцинцевой А.В. отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к кандидатским диссертациям. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 02.00.10 «биоорганическая химия» (химические науки), а также критериям, определенным в пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложением №5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации

Епанчинцева А.В., без сомнения, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 «биоорганическая химия» (химические науки»

18 марта 2020 г.

Ведущий научный сотрудник  
Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот  
Института химической биологии  
И фундаментальной медицины СО РАН

Доктор биологических наук

Миронова Надежда Львовна

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, д. 8  
Рабочий телефон: 8(383)363-51-61  
e-mail: [mironova@niboch.nsc.ru](mailto:mironova@niboch.nsc.ru)

Подпись Мироновой Надежда Львовны заверяю

Ученый секретарь  
ИХБФМ СО РАН,  
к.х.н.



Пестряков Павел Ефимович