

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Тимошенко Валентины Викторовны «Новые РНК-аптамеры и аптасенсоры для детекции аутоантител, характерных для рассеянного склероза», представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Аптамеры, с точки зрения создания диагностических и терапевтических систем, можно рассматривать, как аналоги моноклональных антител. При этом они имеют ряд важных преимуществ перед антителами. Их получение значительно проще, дешевле и быстрее, чем получение моноклональных антител. Они имеют значительно меньший размер, и поэтому легче проникают в ткани и клетки, могут иметь более высокую аффинность и специфичность. В настоящее время достоверно показано, что аптамеры могут обладать уникальной избирательностью и высокими параметрами связывания с мишенью. Диссертация Тимошенко В. В. направлена на дизайн новых РНК-аптамеров, специфических к аутоантителам, характерным для рассеянного склероза, с целью создания на их основе аптасенсоров.

Создание широкого набора методов и подходов для выявления антител, характерных для рассеянного склероза – важная и актуальная с точки зрения изучения механизмов патогенеза РС задача; поэтому актуальность работы Тимошенко В. В. не вызывает сомнений.

Цель диссертационной работы состояла в создании 2'-модифицированных РНК-аптамеров к анти-ОБМ аутоантителам, характерным для рассеянного склероза и конструирование на их основе аптасенсоров для детекции данных аутоантител в препаратах сыворотки крови. Для реализации настоящей цели были решены основные задачи:

получить РНК-аптамеры, способные специфично и с высоким сродством связываться с аутоантителами, исследовать их свойства;

исследовать возможность использования полученных аптамеров как молекулярных узнающих элементов при создании аптасенсоров;

оценить чувствительность и специфичность разработанного метода детекции на индивидуальных препаратах от пациентов с рассеянным склерозом в сравнении с контрольной группы здоровых доноров.

Диссертационная работа Тимошенко В. В. имеет классическую структуру, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа

изложена на 146 страницах, содержит 72 рисунка и 16 таблиц. Библиография включает 174 источника.

Материал обзора литературы «Аптамеры к антителам» подробно изложен на 52 стр.; свидетельствует о тщательном подходе к материалу и полном понимании автором научного ландшафта в конкретной научной области. К сожалению, стиль обзора излишне повествовательный; в нем не хватает критического взгляда на проблему. Случаются попытки обобщения материала, как, например, в таблице 1.2 (стр. 24), но они единичны и не носят тотального характера. Обзор завершается важным заключением, в котором обосновывается необходимость развития темы диссертации как платформы для создания аптасенсоров на широкий спектр иммуноглобулинов.

В экспериментальной части Тимошенко В. В. приводит сведения об используемых реактивах, классе чистоты реагентов и методах исследования. Раздел написан хорошо, хоть и предельно сжато, но вся необходимая для понимания информация приведена.

Часть диссертации «Результаты и их обсуждение» можно условно поделить на четыре решенных задачи.

В первой части были созданы 2'-F-РНК-аптамеры к анти-ОБМ-антителам. Тимошенко В. В. получила серию аптамеров, изучила селективность их связывания с анти-ОБМ-антителами, провела оптимизацию длины и структуры полученных аптамеров. После минимизации структуры наиболее аффинных аптамеров получили две перспективные последовательности - 57 и 26 -мерных олигонуклеотидов. Методом расчета вторичной структуры с использованием сервера mfold было показано, что аптамеры содержат характерные шпилечные структуры.

Вторая часть работы посвящена созданию биолюминисцентных аптасенсоров, способных детектировать анти-ОБМ-аутоантитела. Автор выбрал принцип образования комплексов сэндвич-типа на поверхности микропланшета с последующей оптической детекцией. При исследовании оптических свойств полученных конъюгатов было показано, что конъюгирование с аптамером незначительно влияет на биолюминесцентные свойства белка. Для конъюгата II-9(57) с обелином было показано, что его биолюминесцентная активность составляет 85-90 % от активности свободного обелина.

В продолжении этой части изучали возможность использования созданных 2'-F-РНК-аптамеров не только в качестве репортерного компонента сенсора, но и в качестве «улавливающего» мишень компонента, иммобилизованного в лунке

планшета. Такой подход может работать только при условии наличия разных сайтов связывания аптамеров с мишенью.

Третья-четвертая части посвящены оптимизации протокола использования аптасенсора на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров для анализа клинических образцов и тестированию созданного биолюминесцентного аптасенсора на выборке индивидуальных препаратов сывороток крови от больных РС, здоровых доноров и пациентов с другими неврологическими патологиями. Показано, что чувствительность метода составила 63%, специфичность - 94.2% и позволяет достаточно надежно исключить диагноз РС у пациентов с отрицательным значением сигнала.

Научная новизна работы состоит, в первую очередь, в создании и отборе новых аптамеров к анти-ОБМ аутоантителам, характерным для рассеянного склероза. Важно, что разработанная технология достаточно легко может трансформироваться в целую платформу отбора аптамеров на различные клинические и аналитические молекулы/структуры. В диссертации впервые показана принципиальная возможность использования полученных аптамеров в качестве узнающих элементов аптасенсоров.

В работе выявлены два аптамера, обладающих высокой аффинностью и высокой селективностью связывания анти-ОБМ аутоантител

Показано, что укороченные аптамеры (57 и 26 нуклеотидов) сохраняют высокую аффинность и селективность связывания аутоантител-мишеней и способны распознавать их среди большого избытка аналогичных антител из сыворотки крови.

Показана возможность использования 2'-F-РНК-аптамеров в качестве узнающих элементов для биолюминесцентных микропланшетных аптасенсоров с фотопротеином обелином в качестве репортерной группы.

Биолюминесцентный сенсор на основе пары аптамеров протестирован на большой выборке образцов сывороток крови от пациентов с РС, пациентов с другими патологиями неврологического профиля и здоровых доноров.

Из замечаний следует отметить лишь незначительное количество ошибок, которые самим своим наличием подтверждают, что работа написана человеком, а малым числом – свидетельствуют о тщательности автора при подготовке диссертационной работы.

Замечания по существу работы:

в работе не были получены физико-химические характеристики стабильности вторичных структур полученных аптамеров. Для этих структур в диссертации

приведены значения расчетных ΔG , а экспериментальные значения не получены. Это можно было сделать, и такие данные украсили бы работу;

в части по использованию 2'-F-PHK-аптамеров не только в качестве репортерного компонента сенсора, но и в качестве «улавливающего» мишень компонента, иммобилизованного в лунке планшета, мне хотелось бы увидеть продолжение – анализ клинических образцов.

Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне. Её результаты опубликованы в ведущих международных журналах, в двух патентах РФ и представлены на международных конференциях. Выводы полностью основаны на полученных результатах, которые могут быть чрезвычайно полезны в работах по структурно-функциональной динамике комплексов нуклеиновых кислот (что касается фундаментальной науки) и станут хорошим подспорьем для разработки клинических тестов, основанных на аптамерах. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Тимошенко В. 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 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, а её автор, Тимошенко Валентина Викторовна, безусловно, заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

к.х.н., доцент

21 августа 2020 г.



Коваль В. В.

Коваль Владимир Васильевич, к.х.н., доцент, зам. директора по научной работе, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; 630090, г. Новосибирск, пр-кт академика Лаврентьева, 8; тел.: +7 383 363 51 77, e-mail: koval@niboch.nsc.ru