

В диссертационный совет ПДС 0300.025
при Федеральном государственном автономном
образовательном учреждении высшего образования
«Российский университет дружбы народов
имени Патриса Лумумбы»
117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, главного научного сотрудника,
заведующего лабораторией технологий молекулярной диагностики
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук (ИМБ РАН)
Грядунова Дмитрия Александровича

на диссертацию Эльдиба Ахмеда Абделкадер Мохамед Отман на тему:
“РАСПОЗНАВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ДНК НАНОКОНСТРУКЦИЙ” (Recognition of
nucleic acids using multicomponent DNA nanoconstructs)”, представленную к
защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы диссертации

Одновременное обнаружение патологически измененных клеток с определением в них целевых мишеней и направленным воздействием в режиме реального времени является приоритетным трендом в развитии персонализированной медицины, получившем название «тераностика». Тераностические подходы сочетают в себе визуализацию и специфическую доставку терапевтических компонентов, которая может быть основана на различных биологических принципах. Одним из таких подходов является создание ДНК-нанороботов на основе ДНК-конструкций, способных выполнять сложные логические операции на молекулярном уровне, включая распознавание и связывание со специфичной мишенью в клетке. Одной из проблем является ограничение в чувствительности методов анализа последовательности нуклеиновых кислот, характеризующееся относительно невысоким пределом детекции, что вынуждает исследователей применять технологии амплификации.

В этой связи, исследование Эльдиба Ахмеда Абделкадер Мохамед Отман, посвященное разработке высокочувствительных ДНК-сенсоров и ДНК-процессоров на основе бинарных ДНКзимов (biDz) для распознавания разнообразных клинически значимых целевых РНК-мишеней на основе безамплификационных технологий, является крайне актуальным и может иметь важное практическое значение в медицине.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором разработан ряд оригинальных ДНК-конструкций на основе biDz для:

- распознавания различных концентраций последовательностей РНК раковых маркеров (miR-15-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-7d-let, miR-92a-1 (miR-15, miR-17, miR-21, miR-7, miR-92);
- обнаружения низких концентраций РНК SARS-CoV-2 без ее предварительной амплификации.

Впервые показано, что пороговая концентрация детектируемой микроРНК может быть достигнута посредством изменения количества участков распознавания целевой мишени в ДНК-конструкции. Предложена наноплатформа в виде ДНК-скаффолда, реализующая булеву логику 2AND, 3AND, 2iINHIBIT и 3iINHIBIT, что позволило мультиплексировать систему детекции различных РНК-мишеней и повысить соотношение «сигнал-фон». Одновременное добавление дополнительных РНК-связывающих участков, функции доставки флуорогенного субстрата и дополнительных каталитических центров в ДНК-скаффолд на основе biDz позволило достичь предела обнаружения целевой РНК на уровне 1 пМ и ниже, что является выдающимся показателем для безамплификационных технологий.

Значимость/ценность для науки и практики полученных результатов

Результаты исследования демонстрируют уникальный подход к проектированию ДНК-процессоров, которые объединяют логические операции и молекулярную детекцию, что позволяет выйти за пределы классических методов обнаружения РНК и использовать ДНК-конструкции не только как сенсоры, но и как молекулярные процессоры. Разработанные системы могут реагировать на несколько молекул-мишеней одновременно, что значительно повышает эффективность анализа. Применение молекулярных "вентилей" и структур с адаптивной логикой расширяет возможности современной диагностики и открывает перспективы для молекулярных вычислений.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты исследования могут стать основой для создания новых диагностических наборов, адаптированных под конкретные патологии. В частности, предложенные зонды продемонстрировали высокую эффективность при обнаружении РНК SARS-CoV-2, что подтверждает их актуальность для диагностики возбудителей инфекционных заболеваний. Возможность точной идентификации типов микроРНК также делает разработку перспективной для ранней диагностики онкологических, эндокринных и других патологий.

Разработанные ДНК-машины могут быть адаптированы для использования в мобильных и портативных диагностических устройствах. Это позволило бы расширить их применимость в условиях ограниченного доступа к лабораторному оборудованию. Так, исследование могло бы выиграть от более детального обсуждения интеграции зондов в системы на основе микрофлюидики или в устройства «point-of-care» диагностики.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертация посвящена разработке гибридизационных ДНК-сенсоров для специфичной идентификации последовательностей нуклеиновых кислот - маркеров заболеваний, а также ДНК-процессоров с элементами булевой логики, позволяющих не только распознавать, но и расщеплять целевые РНК-мишени.

Автором постулировано шесть положений, выносимых на защиту, каждое из которых характеризует отдельную часть работы, подкрепленную фактическим экспериментальным материалом. Немаловажно, что положения включают как молекулярно-генетическую составляющую, так и конкретные количественные характеристики создаваемого метода. Перечисленные положения далее раскрываются и обсуждаются в тексте диссертации. Сделанные выводы обоснованы и полностью отражают результаты работы.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Автором опубликовано восемь статей в высокорейтинговых научных журналах, входящих в базы данных Web of Science и Scopus, а также в «Белый список» научных журналов Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Результаты настоящей работы в полной мере отражены в представленных публикациях.

Структура и содержание диссертации

Диссертация Эльдиба Ахмеда Абделкадер Мохамед Отман написана на английском языке и занимает 139 страниц текста, включает 168 источников, проиллюстрирована 72 рисунками и семью таблицами. Раздел «Введение» включает все необходимые подразделы, включая актуальность исследования, цели и задачи, новизну и значимость, положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов и другие формальные пункты.

Глава «Обзор литературы» структурирована в соответствии с объектами исследований и включает шесть больших секций. Первая из них представляет современное состояние методов выявления РНК-онкомаркеров. Приведены ключевые аспекты различных методов, автором сделана попытка критически оценить перспективы применения прямых и непрямых методов обнаружения РНК-мишеней в клиническом материале. Немалая часть обзора литературы посвящена РНК-вирусам и, особенно, SARS-CoV-2 в связи с актуальностью тематики. Особое внимание в обзоре уделено ДНК-зимам, как базовому подходу для создания ДНК-сенсоров и ДНК-процессоров.

В целом, обзор литературы полностью соответствует тематике диссертации, понятен и подробен, предвещает собственные исследования автора.

В главе 2 «Материалы и методы» перечислены используемые в работе реагенты и источники клинических образцов, приведены последовательности гибридизационных зондов. Детальное описание созданной ДНК-сенсоров, методов регистрации флуоресценции гибридизационных комплексов и обработки сигналов свидетельствует о

том, что все эксперименты выполнены Эльдибом Ахмедом Абделкадер Мохамед Отман самостоятельно.

Глава «Результаты и обсуждение» представлена двумя большими разделами «Molecular Computation» и «Diagnostics». В первом из них подробно описываются подходы к созданию ДНК-процессоров на основе biDz для мультиплексной детекции онкогенных микроРНК, второй посвящен выявлению РНК SARS-CoV-2.

В диссертации был бы уместен раздел «Заключение», в котором автор мог бы резюмировать основные результаты и обосновать их перспективы, например, применение созданных технологий в устройствах для 'point-of-care' диагностики.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью отражает содержание диссертации, тщательно оформлен, хорошо проиллюстрирован, однако также содержит некоторое количество орфографических и речевых ошибок.

Замечания и вопросы по работе

Как и в любом научном исследовании, к работе Эльдиба Ахмеда Абделкадер Мохамед Отман можно предъявить ряд вопросов и замечаний:

1. В своем исследовании автор использует регистрацию флуоресцентных сигналов. Очевидно, что в данном случае первостепенное значение имеет вопрос калибровки/нормировки сигнала и количественная оценка вклада различных физико-химических факторов, которые могут и реально оказывают влияние на результат измерений. Хотя автор и не обходит стороной эти вопросы, целый ряд параметров протокола измерений подразумевает внесение погрешностей. Поэтому остается вопрос, проводили ли прямую проверку результатов на модельных структурах дуплексов с контролируемой степенью гибридизации?

2. Зависимость эффективности распознавания РНК-молекул от вторичной структуры аналита. Насколько универсальной является предложенная технология?

3. В обсуждении было бы интересно прочитать о перспективах мультиплексной детекции множества РНК-молекул с использованием одного ДНК-сенсора. Как изменился бы предел детекции при одновременном выявлении множества различных мишеней, какая предельная емкость ДНК-сенсора (количество аналитов) могла бы быть достигнута и т.д.?

4. Предложенный автором подход является уникальным и оригинальным, создает базис для практического применения, однако среди работ автора отсутствуют патенты на изобретения.

5. К сожалению, работа содержит некоторое количество орфографических опечаток.

Вышеперечисленные замечания не умаляют достоинства работы, выполненной Эльдибом Ахмедом Абделкадер Мохамед Отман на самом современном уровне. Совокупность полученных результатов можно квалифицировать как создание нового метода в тераностике в виде детекции и специфичном расщеплении клинически значимых

РНК-мишеней. Достоверность результатов сомнений не вызывает, они опубликованы в ведущих зарубежных, доложены на международных конференциях.

Заключение

Полученные результаты и положения диссертационной работы имеют важное научное и практическое значение. Диссертационное исследование Эльдиба Ахмеда Абделкадер Мохамеда Отмана «Распознавание нуклеиновых кислот с использованием многокомпонентных ДНК наноконструкций» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований предложен инновационный метод на основе ДНК-сенсоров и ДНК-процессоров для эффективной, быстрой и сверхчувствительной детекции биомаркеров социально-значимых заболеваний. Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, согласно п.2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», утвержденного Ученым советом РУДН, протокол № УС-1 от 22.01.2024г., а её автор Эльдиб Ахмед Абделкадер Мохамед Отман заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент

главный научный сотрудник,

заведующий лабораторией технологий молекулярной диагностики ИМБ РАН

Доктор биологических наук
по специальности 03.01.03
«молекулярная биология»

Грядунув Дмитрий Александрович

119991 г. Москва, ул. Вавилова, д.32. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

Тел (499) 135-23-11. E-mail isinfo@eimb.ru

Грядунув Дмитрий Александрович. Тел. (916) 126-51-91. Эл. почта grad@biochip.ru

Подпись Грядунува Дмитрия Александровича
заверяю

Ученый секретарь ИМБ РАН, к.ф-м.н.



Коновалова Е.В.

«5» марта 2025 г.