

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01

на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 14 марта 2018 г. № 4

О присуждении **Апарину Илье Олеговичу**, гражданину РФ, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Азидопроизводные красителей и нуклеозидные реагенты на основе хиральных 1,3-диолов для синтеза флуоресцентных ДНК-зондов» по специальности 02.00.10 – биорганическая химия принята к защите 20.12.2017 г., протокол № 23 диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10 (действует на основании приказа Минобрнауки России №75/нк от 15 февраля 2013 г.).

Соискатель Апарин Илья Олегович 1990 года рождения. В 2012 году окончил федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова». В 2012 году поступил в очную аспирантуру федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, которую окончил 2016 году. В настоящее время работает в должности инженера в лаборатории органического синтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Диссертация выполнена в лаборатории органического синтеза федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

Научный руководитель - доктор химических наук **Формановский Андрей Альфредович**, заведующий лабораторией органического синтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Официальные оппоненты:

Готтих Марина Борисовна, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела химии нуклеиновых кислот Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова

Тимофеев Эдуард Николаевич, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории дизайна и синтеза биологически активных соединений ФГБУ «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта» РАН

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, в своем положительном заключении, подписанном к.х.н., с.н.с. лаборатории химии РНК Новопашиной Д.С. и утвержденном директором Института д.х.н., проф., чл.-корр. РАН Пышным Д.В. указала, что диссертационная работа Апарина Ильи Олеговича соответствует всем критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

Соискатель имеет 6 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 5 статей в рецензируемых научных изданиях общим объемом 25 печ. листов, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Министерством образования и науки Российской Федерации для опубликования результатов диссертаций, и индексируемых базами данных Scopus и Web Of Science. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных автором работах. Научные работы по теме диссертации, в которые автор внёс основной или существенный вклад:

1. Aparin I.O., Farzan V.M., Veselova O.A., Chistov A.A., Podkolzin A.T., Ustinov A.V., Shipulin G.A., Formanovsky A.A., Korshun V.A. and Zatsepin T.S. 1-Phenylethynylpyrene (PEPy) as a novel blue-emitting dye for qPCR assay. *Analyst*, **2016**, 141(4), 1331–1338.

2. Farzan V.M., Aparin I.O., Veselova O.A., Podkolzin A.T., Shipulin G.A., Korshun V.A., Zatsepin T.S. Cy5/BHQ dye–quencher pairs in fluorogenic qPCR probes: effects of charge and hydrophobicity. *Anal. Methods*, **2016**, 8(29), 5826–5831.

3. Tsybulsky D.A., Kvach M.V., Ryazantsev D.Y., Aparin I.O., Stakheev A.A.,

Prokhorenko I.A., Martynenko Y.V., Gontarev S.V., Formanovsky A.A., Zatsepin T.S., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zavriev S.K. Molecular beacons with JOE dye: Influence of linker and 3' couple quencher. *Mol. Cell. Probes*, **2016**, 30(5), 285–290.

4. Aparin I.O., Proskurin G.V., Golovin A.V., Ustinov A.V., Formanovsky A.A., Zatsepin T.S. and Korshun V.A. Fine Tuning of pyrene excimer fluorescence in molecular beacons by alteration of the monomer structure. *J. Org. Chem.*, **2017**, 82(19), 10015–10024.

5. Farzan V.M., Ulashchik E.A., Martynenko-Makaev Y.V., Kvach M.V., Aparin I.O., Brylev V.A., Prikazchikova T.A., Maklakova S.Y., Majouga A.G., Ustinov A.V., Shipulin G.A., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zatsepin T.S. Automated solid phase click synthesis of oligonucleotide conjugates: from small molecules to diverse N-acetylgalactosamine clusters. *Bioconj. Chem.*, **2017**, 28(10), 2599–2607.

На диссертацию поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.х.н., проф. Готгих Марины Борисовны. Отзыв положительный. Отзыв не содержит принципиальных замечаний к содержанию диссертации, однако, в нем указывается о наличии стилистических и грамматических ошибок и опечаток, неудачных оборотов и выражений. Отмечается, что некоторые фразы подписи к рисункам не очень понятны.

Отзыв официального оппонента д.х.н., проф. Тимофеева Эдуарда Николаевича. Отзыв положительный. Содержит следующие замечания: 1) В литературном обзоре отсутствуют ссылки на структуры, представленные на рисунке 1.2. 2) В тексте диссертации не содержится четкого описания процедуры определения термической стабильности самих молекулярных маяков и их дуплексов с комплементарной мишенью. 3) При анализе распределения интенсивностей эксимерной, мономерной и фоновой флуоресценции различия в термической стабильности маяков и их гетеродуплексов не принимаются в расчет. Остальные замечания относятся к опечаткам, неудачным выражениям, несогласованным предложениям и необоснованным англицизмам.

Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный. Содержит следующие замечания: 1) Отсутствие формулировки цели и постановки задач исследования, как во введении, так и в самом тексте диссертации. 2) Отсутствие рисунков к описанию большого количества реакций и структур зондов в литературном обзоре. 3) В разделе 2.1.2 при обсуждении результатов термической денатурации «шпилечных» структур зондов утверждается, что происходит повышение температур плавления за счет взаимодействия

остатков флуорофоров и тушителей, введенных на 3'- и 5'-конец зонда, друг с другом или последовательностью зонда. На каком основании делается этот вывод? 4) В разделе 2.3 описано введение до 15 линкерных групп, содержащих Су5 и азидогруппу, в состав иммуноглобулина G, а также последующее присоединение модельных олигонуклеотидов по этим группам. Есть ли необходимость столь множественной модификации и будет ли сохраняться функциональная активность IgG в результате таких изменений в структуре? В отзыве содержится ряд рекомендаций к оформлению работы следующего характера: 1) Из-за большого количества ссылок и сжатости объема некоторые части обзора изложены поверхностно, более полезным мог бы быть обзор на более узкую тему. 2) Название главы «Обсуждение результатов» - «Мономеры на основе D-(-)-пантолактона и азидопроизводные для мечения олигонуклеотидов», не соответствует названию диссертационной работы. Остальные замечания относятся к опечаткам и неудачным выражениям.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высокой квалификацией самих оппонентов и сотрудников ведущей организации, их вкладом в развитие области химии и биологии нуклеиновых кислот, что подтверждается большим количеством научных публикаций в ведущих научных журналах по тематикам схожим с выполненной диссертантом работой. Их высокая квалификация позволяет дать объективную оценку научной и практической значимости данной диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что в своей работе Апарин И.О. затрагивает сразу ряд актуальных проблем связанных с дизайном флуоресцентных ДНК-зондов и методами конъюгации синтетических олигонуклеотидов. В работе были предложены новые флуоресцентные маркеры олигонуклеотидных зондов, разработаны новые подходы к дизайну ДНК-зондов, в том числе применяемых в методе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Проведена детальная оптимизация структуры олигонуклеотидных зондов, а также подробный анализ их фотофизических параметров, как в модельных экспериментах, так и при проведении количественного ПЦР для определения реальных объектов с применением полученных зондов. Кроме того, в работе описано несколько оригинальных методологических подходов к решению проблем получения конъюгатов олигонуклеотидов. Во-первых, предложена новая схема проведения модификации синтетических олигонуклеотидов по реакции медь(I)-

катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения непосредственно после синтеза полимера на твердой фазе, позволяющая сократить количество стадий получения и очистки конъюгатов. Проведен подбор оптимальных условий реакции с участием ряда растворителей и катализаторов, а процедура модификации отработана с участием ряда синтезированных функциональных азидопроизводных. Во-вторых, автором была разработана уникальная технология получения конъюгатов иммуноглобулинов с синтетическими фрагментами ДНК, позволяющая просто оценить степень протекания реакции и стехиометрию конечных ДНК-белковых конъюгатов. Приводится синтез новых реагентов для конъюгации иммуноглобулинов в мягких условиях, процедуры модификации биополимеров и их конъюгации, а также данные физико-химического анализа на каждой стадии модификации иммуноглобулина и олигонуклеотида и их конъюгации.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что предложены новые подходы в дизайне флуоресцентных ДНК-зондов, оптимизации флуоресцентных параметров новых флуоресцентных маркеров, выявлены закономерности поведения пиреновых флуорофоров в составе олигонуклеотидных последовательностей. Предложена новая методология для модификации синтетических олигонуклеотидов с участием ряда низкомолекулярных азидопроизводных.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что предложены и разработаны новые подходы для получения востребованных для диагностических целей конъюгатов синтетических олигонуклеотидов с флуоресцентными красителями, прочими функциональными соединениями, а также белками иммуноглобулиновой природы. Предложены новые флуоресцентные метки ДНК-зондов с улучшенными флуоресцентными параметрами, в частности для TaqMan зондов, применяющихся в методе количественной полимеразной цепной реакции. Проведена оптимизация структуры зондов с эффективной донорно-акцепторной парой на основе эксимер-образующих пиреновых меток и цианинового красителя сульфо-Су3, потенциально полезных для разделения каналов возбуждения и детекции флуоресценции в спектральном диапазоне для использования в гибридных методах анализа.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что работа выполнена на высоком экспериментальном и теоретическом уровне с подробным описанием всех стадий исследования, приведением корректно полученных аналитических данных и их анализа.

Детально проработанный обзор литературы по тематике работы дает исчерпывающее представление об обоснованности и оригинальности идей, а также востребованности представленных в диссертации решений, список литературы содержит 346 ссылки на современные публикации. Автор предоставляет все необходимые аналитические данные, подтверждающие корректность полученных результатов и представленных выводов.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в проведении научных экспериментов. Основные результаты работы были получены лично автором, за исключением проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (м.н.с. О.А. Веселова, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), синтеза олигонуклеотидов и ДНК-зондов (доцент Т.С. Зацепин и м.н.с. В.М. Фарзан, Сколковский институт науки и технологий), проведения молекулярного моделирования фрагментов олигонуклеотидных зондов с пиреновой парой (с.н.с. А.В. Головин, МГУ им. М.В. Ломоносова), измерения кинетических кривых затухания флуоресценции (с.н.с. Е.В. Хайдуков, ИПЛИТ РАН). Автор лично проводил все остальные эксперименты, синтезировал описанные соединения, измерял и проводил оценку фотофизических параметров ДНК-зондов, конъюгацию олигонуклеотидов и иммуноглобулина. Он также принимал персональное участие в анализе полученных данных и написании всех публикаций по теме диссертации.

На заседании 14 марта 2018 г. диссертационный совет принял решение присудить Апарину И.О. ученую степень кандидата химических наук. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 7 докторов наук по профилю представленной диссертации (специальность 02.00.10 - биорганическая химия), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 23, против 0, недействительных бюллетеней 0.

Заместитель председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

