

Заключение экспертной комиссии диссертационного совета 24.1.218.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

от 16.06.2025 (шестнадцатого июня две тысячи двадцать пятого года)
(протокол № 3)

по принятию к защите диссертационной работы Ахметзяновой Лианы Ульфатовны на тему «Моделирование реакции петлевой изотермической амплификации и создание компьютерных программ дизайна праймерных систем», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки).

Председатель комиссии: д.б.н., Баймиев Андрей Ханифович

Члены комиссии:

д.б.н., Кулуев Булат Разяпович

д.б.н., доцент Баймиев Алексей Ханифович

Комиссия диссертационного совета 24.1.218.01 рассмотрела документы диссертационной работы о принятии к защите диссертации младшего научного сотрудника лаборатории структуры и функций биополимеров Ахметзяновой Лианы Ульфатовны на тему «Моделирование реакции петлевой изотермической амплификации и создание компьютерных программ дизайна праймерных систем», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки).

Научный руководитель: Чемерис Алексей Викторович, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра РАН (ИБГ УФИЦ РАН).

Комиссия пришла к следующему заключению:

1. Актуальность темы

В настоящее время все более широкое применение находит анализ биологических образцов путем обнаружения в них специфических последовательностей нуклеиновых кислот (НК) с помощью амплификации – ферментативной реакции, приводящей к наработке фрагментов ДНК в количестве, которое может быть детектировано инструментальными методами. Разработано множество методов амплификации НК, различающихся вариантами проведения реакции и способами детекции ее результатов. Самым популярным методом остается полимеразная цепная реакция – ПЦР, которая включает несколько этапов, протекающих при разных температурах. Однако из-за необходимости термоциклирования продолжительность ПЦР составляет около 1,5 ч, в связи с этим растет интерес к более быстрым реакциям амплификации, протекающим при постоянной температуре. Среди таковых наиболее популярной стала петлевая изотермическая амплификация – LAMP. LAMP наиболее широко применяется для быстрой детекции генетического материала бактериальных и вирусных патогенов. Активное развитие метод LAMP получил с началом пандемии COVID-19 для обнаружения SARS-CoV-2.

В отличие от классической ПЦР, для проведения которой необходимы два праймера (прямой и обратный), для протекания реакции LAMP требуется более сложная система праймеров. В первоначально предложенном варианте LAMP использовались два внешних – F3 и B3, и два внутренних – FIP и BIP праймера. F3 и B3 необходимы для образования одноцепочечной ДНК и требуются только на начальном этапе. Мотивы F1c и B1c в составе FIP и BIP отжигаются позже на синтезирующихся цепях ДНК. За счет них формируются гантелеподобные (dumbbell) структуры, запускающие наработку продуктов разной длины – лампликонов. Для ускорения наработки лампликонов было добавлено еще два праймера, отжигающихся на участках между последовательностями F1c и F2, а также между B1c и B2, получившие название петлевых (FLP и BLP, или LoopF и LoopB). Были сделаны и другие попытки добиться ускорения протекания LAMP за счет использования стержневых праймеров или дополнительных внутренних праймеров, но они характеризуются своими недостатками и требуются иные подходы для достижения этой цели.

Дизайн LAMP-праймеров представляет собой трудную задачу, при этом количество соответствующих компьютерных программ их подбора не превышает десяти. Существующие программы имеют определенные ограничения: позволяют осуществлять подбор на основе ограниченных по длине нуклеотидных последовательностей, не учитывают возможность образования гомо- и гетеродимеров праймеров, не позволяют подбирать мультиплексные праймерные системы. Это приводит к подбору праймеров

недостаточно высокого качества, что часто обуславливает получение недостоверных результатов LAMP-анализа. Таким образом, создание инструмента для дизайна «качественных» праймеров для петлевой изотермической амплификации является актуальной задачей.

2. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Определение темы диссертационной работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научным руководителем – д.б.н. Чемерисом А.В. Автор оптимизировал номенклатуру и смоделировал структуру продуктов LAMP-реакции. Разработал новые варианты реакции и смоделировал соответствующие молекулярные схемы. Автор лично разработал пять компьютерных программ для подбора LAMP-праймеров. Автором систематизированы результаты исследования, подготовлены и опубликованы печатные работы в различных журналах, которые отражают основные результаты работы.

3. Достоверность результатов проведенных исследований

Объективность и достоверность полученных результатов подтверждает использование современного научного оборудования, применение актуальных методов и методик, а также корреляцией с литературными данными. Анализ результатов проведен с применением различных приемов статистической обработки и привлечением достаточного числа биологических и аналитических повторностей. Выводы, сформулированные по результатам диссертационной работы, соответствуют поставленным задачам.

Результаты диссертационного исследования были представлены на следующих конференциях: Международная научная конференция «Параллельные вычислительные технологии (ПаВТ'2020)» (г. Пермь, 2020 г.), Международная научная конференция «Уфимская осенняя математическая школа» (г. Уфа, 2020 г.), XXVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», секция «Биоинженерия и биоинформатика» (г. Москва, 2020 г.), Международную конференцию «Марчуковские научные чтения» (г. Новосибирск, 2020 г.), IX Международная научная молодежная школа-семинар «Математическое моделирование, численные методы и комплексы программ имени Е.В. Воскресенского» (г. Саранск. 2020 г.), XIII Всероссийская научная интернет-конференция Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии (г. Уфа, 2021 г.), Международная научно-практическая конференция «Интеллектуальные информационные технологии и

математическое моделирование (ИИТ&ММ-2021)» (г. Геленджик, п. Дивноморское, 2021 г.), Международная научная конференция «Уфимская осенняя математическая школа» (г. Уфа, 2021 г.), Международная научная конференция «Параллельные вычислительные технологии (ПаВТ'2021)» (г. Волгоград, 2021 г.), The Thirteenth International Multiconference. Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022) (г. Новосибирск, 2022 г.), Международная научно-практическая конференция «Интеллектуальные информационные технологии и математическое моделирование (ИИТ&ММ-2022)» (г. Геленджик, п. Дивноморское, 2022 г.), Международная научная конференция «Параллельные вычислительные технологии (ПаВТ'2021)» (г. Челябинск, 2024 г.).

4. Научная новизна и практическая значимость

Предложена новая система обозначений (номенклатура) зон отжига LAMP-праймеров, облегчающая понимание структуры праймеров и продуктов реакции, а также подбор нетипичных праймерных систем. Разработан новый алгоритм подбора LAMP-праймеров, включающий новую математическую модель расчета температуры отжига праймеров и подразумевающий задание более жестких критериев их отбора и возможность сближения зон отжига. Разработаны новые варианты LAMP, предназначенные для обнаружения специфических НК-мишеней. Написано пять компьютерных программ для дизайна специфичных LAMP-праймеров: LAMPprimers iQ (Loop-mediated isothermal amplification Primers iQ), позволяет подбирать четыре стандартных праймера при жестких условиях; Дизайн праймеров для петлевой изотермической амплификации (LAMPprimers iQ_loop), позволяет подбирать шесть праймеров, включая петлевые; Дизайн олигонуклеотидных шпилечных структур для лигирования на поддерживающей матрице и последующей LAMP-амплификации (LigLAMP), проектирует ДНК-шпильки, лигируемые на микроРНК, и праймеры для LAMP мишени, образующейся при лигировании; «Дизайн праймеров для LAMP-амплификации микроРНК (miRLAMP)», позволяет детектировать микроРНК с помощью LAMP; Дизайн множественных внутренних праймеров для петлевой изотермической амплификации (MIP-LAMP).

5. Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Диссертационная работа изложена на 142 страницах, состоит из введения, обзора литературы (глава I), описания материалов и методов (глава II), обсуждения результатов

(глава III), выводов и списка литературы (220 наименований). Работа содержит 8 таблиц и 36 рисунков.

По материалам диссертационной работы опубликовано 17 научных трудов, из них 5 статей в журналах, индексируемых в WoS/Scopus и/или из перечня ВАК, 4 статьи в РИНЦ, 8 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях. Получено 4 свидетельства о регистрации программ для ЭВМ

Научные статьи:

1. Akhmetzianova L.U., Mikhaylenko C.I., Chemeris D.A., Khairitdinov V.D., Sakhabutdinova A.R., Gubaydullin I.M., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V. Modeling a Standard Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction and Its Modification Involving Additional Inner Primers // *Biomolecules*. 2025. V.15(5):690. doi.org/10.3390/biom15050690. Scopus, WoS (Q1, K1)
2. Ахметзянова Л.У. Компьютерная программа подбора праймеров для LAMP-амплификации // *Advanced engineering research*. 2024. Т. 24(1). С. 98-108. ВАК.
3. Akhmetzianova L.U, Davletkulov T.M, Sakhabutdinova A.R, Chemeris A.V, Gubaydullin I.M, Garafutdinov R.R. LAMPprimers iQ: New primer design software for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // *Anal Biochem*. 2023. 2(684):115376. doi: 10.1016/j.ab.2023.115376. WoS, Scopus, ВАК (Q3, K2)
4. Ахметзянова Л.У., Давлеткулов Т.М., Гарафутдинов Р.Р., Губайдуллин И.М. Применение алгоритма Ахо-Корасик для подбора праймеров для петлевой изотермической амплификации // *Математическая биология и биоинформатика*. 2022. Т. 17(2). С.250-265. doi: 10.17537/2022.17. ВАК, Scopus (Q4).
5. Akhmetzianova L.U., Davletkulov T.M., Gubaidullin I.M., Islamgulov A.R. Parallel implementation of the primer search algorithm for loop-mediated isothermal amplification // *Journal of Physics: Conference Series*. 2021. V. 2131(2):022004. doi.org/10.1088/1742-6596/2131/2/022004. Scopus (Q4, K3).
6. Кирьянова О.Ю., Ахметзянова Л.У., Губайдуллин И.М. Алгоритмы поиска в задачах анализа нуклеотидных последовательностей с целью однозначной идентификации геномов // *Вестник Башкирского университета*. 2020. Т. 25(2). С. 285-290. doi.org/10.33184/bulletin-bsu-2020.2.10. ВАК.

6. Специальность, которой соответствует диссертация

Диссертационное исследование Ахметзяновой Лианы Ульфатовны соответствует паспорту научной специальности 1.5.3. Молекулярная биология, и охватывает направления (1. Физико-химия биополимеров, их компонентов и комплексов; 3. Структура

геномов, геномика, эпигеномика и транскриптомика. Биоинформатические методы анализа баз данных последовательностей ДНК, РНК и белков, в том числе при патологии у человека).

7. Ценность научных работ соискателя.

Предложенная система обозначений зон отжига значительно облегчает понимание структуры LAMP-праймеров и лампликонов и обеспечивая более точный подбор праймерных систем, особенно для нетрадиционных вариантов реакции. Разработаны компьютерные программы дизайна LAMP-праймеров для разных вариантов реакции, в том числе для микроРНК и для обнаружения любых НК-мишеней с увеличенной скоростью анализа. Показана принципиальная возможность обнаружения специфических НК-мишеней с помощью праймеров, сконструированных разработанными компьютерными программами.

8. Научная зрелость соискателя

Ахметзянова Л.У. выполнила большой объем теоретической и экспериментальной работы по изучению методов амплификации, разработала компьютерные программы дизайна LAMP-праймеров для разных вариантов реакции. При непосредственном участии Ахметзяновой Л.У. были выполнены все этапы экспериментальных исследований, а также обработка, анализ, и, что немаловажно, оформление полученных результатов в виде рукописей, опубликованных в высокорейтинговых научных изданиях. Ахметзянова Л.У. показала себя как высококвалифицированный, грамотный и ответственный исследователь, имеющий высокий уровень профессиональной подготовки и обладающий всеми необходимыми знаниями и навыками, присущими специалистам в области молекулярной биологии.

9. Проверка диссертации на заимствованного материала без ссылки на авторов.

В тексте диссертации соискатель ссылается на авторов и источники заимствования материалов и отдельных результатов, также отмечает полученные лично и (или) в соавторстве результаты, что соответствует п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842. Итоговая оценка оригинальности по системе проверки использования заимствованного материала без ссылки на автора составила 91,64 % (заключение экспертной комиссии и автоматический отчет прилагаются).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Экспертная комиссия единогласно решила, что диссертационная работа Ахметзяновой Лианы Ульфатовны «Моделирование реакции петлевой изотермической амплификации и создание компьютерных программ дизайна праймерных систем», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки) представляет собой научно-квалификационную работу, которая соответствует критериям п.9-11,13,14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации, отмечено отсутствие в диссертации заимствованного материала без ссылок на авторов или источники заимствования. Диссертационная работа Ахметзяновой Лианы Ульфатовны «Моделирование реакции петлевой изотермической амплификации и создание компьютерных программ дизайна праймерных систем» может быть рекомендована к официальной защите на Диссертационном совете 24.1.218.01, по специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки).

Утвердить официальных оппонентов, обратив внимание на их научные публикации:

Рыкову Елену Юрьевну – доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории регуляции экспрессии генов «Федеральный исследовательский центр Института цитологии и генетики» СО РАН, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева д. 10, тел.: +7-913-456-48-36, e-mail: atos@bionet.nsc.ru, сайт: <https://www.icgbio.ru/>

Грядунова Дмитрия Александровича - доктора биологических наук, главного научного сотрудника, заведующего лабораторией технологий молекулярной диагностики Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32, <http://www.eimb.ru/> рабочая эл. почта: grad@biochip.ru, раб. телефон: 8(499)135-23-11, 8(499)135-11-606.

Утвердить ведущую организацию, обратив внимание на то, что одно из основных направлений научно-исследовательской деятельности структурного подразделения, где будет проходить обсуждение, соответствует тематике диссертации соискателя:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН), 142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3, тел.: +7 (4967) 73-25-80, e-mail: odou.iteb@yandex.ru, сайт: <https://iteb.ru/>, и.о.директора к.б.н. Фадеева Ирина Сергеевна

Председатель экспертной комиссии Диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук:

д.б.н., Баймиев Андрей Ханифович (по специальности 1.5.3. Молекулярная биология)



Члены комиссии:

д.б.н., Кулуев Булат Разяпович (по специальности 1.5.3. Молекулярная биология)

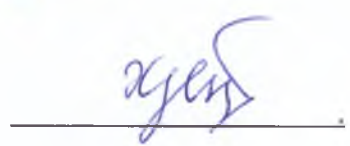


д.б.н., доцент Баймиев Алексей Ханифович (по специальности 1.5.3. Молекулярная биология)



Председатель диссертационного совета 24.1.218.01

д.б.н., проф. член корр. РАО Хуснутдинова Э. К.



Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.218.01

д.б.н., доцент Корицина Г. Ф.



Дата: 16.06.2025 (шестнадцатое июня две тысячи двадцать пятого года)