ОТЗЫВ

официального рецензента на диссертационную работу

Шайзадиновой Айши Маратовны на тему «Изучение новых программируемых РНК-направляемых эндонуклеаз CRISPR/Cas систем для применения в диагностике», предоставленную на соискание степени доктора философии (PhD)по специальности «8D05105 – Биотехнология»

№ п/п	Критерии	Соответствие критериям (подчеркнуть один из вариантов ответа)	Обоснование позиции официального рецензента (замечания выделить курсивом)
1.	Тема диссертации (на дату ее утверждения) соответствует направлениям развития науки и/или государственным программам	1.1 Соответствие приоритетным направлениям развития науки или государственным программам:	Диссертационная работа Шайзадиновой Айши выполнена в рамках государственных и целевых научных проектов AP09259771 «Характеристика новых программируемых РНК-направляемых эндонуклеаз CRISPR/CAS систем для применения в диагностике», BR10764944 «Разработка методов аналитического контроля и проведения мониторинга безопасности пищевой продукции», AP19579275 «Разработка современной молекулярной диагностики патогенов сельскохозяйственных культур на основе метода CRISPR/Cas12a». Работа полностью соответствует приоритетным направлениям развития науки, объединяя аспекты молекулярной биологии, биотехнологии и ветеринарии. Основное внимание уделено разработке новых РНК-направляемых эндонуклеаз Cas12a и созданию высокочувствительных методов молекулярной диагностики патогенов, что имеет практическое значение для мониторинга инфекционных агро- и зоо-патогенов, а также для обеспечения безопасности пищевой продукции.
		1) диссертация выполнена в рамках проекта или целевой программы, финансируемого(ой) из государственного бюджета (указать название и номер проекта или программы);	
		2) диссертация выполнена в рамках другой государственной программы (указать название программы);	
		3) диссертация соответствует приоритетному направлению развития науки, утвержденному Высшей научно-технической комиссией при Правительстве Республики Казахстан (указать направление).	
2.	Важность для науки	Работа **вносит**/не вносит существенный вклад в науку, а ее важность **хорошо раскрыта**/не раскрыта.	Работа вносит существенный вклад в развитие науки, что проявляется в исследовании новых ранее не изученных РНК-направляемых эндонуклеаз Cas12a из Moraxella bovis и Moraxella equi, а также в создании на их основе чувствительных и специфичных методов молекулярной диагностики патогенов. Значимость диссертации обусловлена тем, что она объединяет фундаментальные исследования по характеристике структуры и функции эндонуклеаз с прикладными аспектами диагностики

			микроорганизмов, влияющих на здоровье животных и качество пищевой продукции. Актуальность работы подтверждается современными потребностями в быстрой, точной и надежной идентификации инфекционных агро- и зоопатогенов, что делает результаты исследования востребованными для научного сообщества и практического применения.
3.	Принцип самостоятельности	Уровень самостоятельности: **1) высокий;** 2) средний; 3) низкий; 4) самостоятельности нет.	Уровень самостоятельности соискателя Шайзадиновой А.М. оценивается как высокий. Личный вклад докторанта прослеживается от разработки дизайна экспериментов до непосредственного выполнения лабораторных экспериментов, а также анализа полученных данных и интерпретации результатов. Кроме того, высокая самостоятельность подтверждается в том, что Шайзадинова А.М. выступает первым автором в двух публикациях с ненулевым импакт-фактором.
4.	Принцип внутреннего единства	4.1 Обоснование актуальности диссертации: **1) обоснована;** 2) частично обоснована; 3) не обоснована.	Актуальность диссертационного исследования обоснована и подтверждается современными тенденциями развития молекулярной биологии и биотехнологии, в частности расширением области применения CRISPR/Cas-систем в диагностике инфекционных агентов. В диссертации обоснован выбор объекта исследования — новых эндонуклеаз MbCas12a и MeCas12a, обладающих потенциалом практического использования в ветеринарии, сельском хозяйстве и смежных областях биомедицины. Обоснование актуальности основано как на мировом научном контексте (быстрое развитие технологий CRISPR-диагностики), так и на национальных приоритетах, связанных с безопасностью продуктов питания и контролем патогенов сельскохозяйственного и ветеринарного значения.
		4.2 Содержание диссертации отражает тему диссертации: **1) отражает;** 2) частично отражает; 3) не отражает.	Содержание работы полностью соответствует заявленной теме. В диссертации представлено исследование новых гомологов Cas12a, проведён их структурно-функциональный анализ, подтверждена нуклеазная активность. Осуществлена разработка и апробация молекулярно-диагностических подходов на основе полученных

			ферментов. Таким образом, содержание диссертации логически последовательно, согласовано и отражает тему диссертации.
		4.3. Цель и задачи соответствуют теме диссертации:	Цель исследования согласована с тематикой диссертации и направлена на комплексное изучение новых аналогов Cas12a и их применения в молекулярной диагностике. Задачи исследования логично вытекают из поставленной цели, охватывают анализ структурно-функциональных параметров белков, проведение экспериментальных исследований и разработку диагностических подходов. Цель и задачи внутренне взаимосвязаны и отражают содержание диссертации.
		1) соответствуют;	
		2) частично соответствуют;	
		3) не соответствуют.	
		4.4 Все разделы и положения диссертации логически взаимосвязаны:	Все разделы и основные положения диссертации полностью взаимосвязаны. Структура работы выстроена последовательно: от постановки цели и задач исследования — к изложению методологии, полученным результатам, их интерпретации и практической значимости. Теоретическая часть органично связана с экспериментальной, а выводы обоснованно вытекают из представленных данных.
		1) полностью взаимосвязаны;	
		2) взаимосвязь частичная;	
		3) взаимосвязь отсутствует.	
		4.5 Предложенные автором новые решения (принципы, методы) аргументированы и оценены по сравнению с известными решениями:	В диссертации представлен критический анализ характеристик новых гомологов Cas12a (MbCas12a и MeCas12a) в сопоставлении с известными ферментами данной группы, что подтверждает научную новизну и достоверность предложенных решений. Однако в части разработанных диагностических подходов прямое сравнение с существующими аналогичными методами ограничено обзором литературы и не представлено в экспериментальной части, что определяет частичный характер анализа.
		1) критический анализ есть;	
		2) анализ частичный;	
		3) анализ представляет собой не собственные мнения, а цитаты других авторов;	
		4) анализ отсутствует.	
5.	Принцип научной новизны	5.1 Научные результаты и положения являются новыми?	Впервые охарактеризованы гомологи Cas12a (MbCas12a и MeCas12a), установлены их структурные и функциональные параметры, а также определены новые таргетные последовательности для диагностики.
		1) полностью новые;	
		2) частично новые (новыми являются 25-75%);	
		3) не новые (новыми являются менее 25%).	

		5.2 Выводы диссертации являются новыми?	Выводы основаны на оригинальных исследованиях автора, включающих как характеристику ранее не изученных ферментов, так и экспериментальное подтверждение их эффективности при работе с новыми ДНК-мишенями.
		1) полностью новые;	
		2) частично новые (новыми являются 25-75%);	
		3) не новые (новыми являются менее 25%).	
		5.3 Технические, технологические, экономические или управленческие решения являются новыми и обоснованными:	В диссертации представлены новые таргетные последовательности и усовершенствованные подходы к молекулярной диагностике, при этом основа методологии базируется на ранее известных принципах CRISPR/Cas-систем и стандартных биотехнологических процедурах.
		1) полностью новые;	
		2) частично новые (новыми являются 25-75%);	
		3) не новые (новыми являются менее 25%).	
6.	Обоснованность основных выводов	Все основные выводы основаны/не основаны на весомых с научной точки зрения доказательствах либо достаточно хорошо обоснованы (для qualitative research (куолитатив ресеч) и направлений подготовки по искусству и гуманитарным наукам).	Все основные выводы диссертации основаны на весомых с научной точки зрения доказательствах и подтверждены результатами экспериментальных исследований. Применённые методы молекулярной биологии, генной инженерии, биоинформатики и функционального анализа обеспечили высокую степень достоверности полученных данных. Таким образом, выводы диссертации являются научно обоснованными и полностью соответствуют заявленной тематике исследования.
7.	Основные положения, выносимые на защиту	Необходимо ответить на следующие вопросы по каждому положению в отдельности:	Основных положений диссертации, выносимых на защиту, представлено 4. **Положение 1: Функционально активные рекомбинантные белки MbCas12a и MeCas12a из *Moraxella bovis* и *Moraxella equi* представлены в качестве новых аналогов Cas12a, обладающих подтверждённой in vitro нуклеазной активностью в комплексе с направляющими crРНК. Оптимизированная схема экспрессии и очистки обеспечивает получение высокоочищенных белков.** 7.1 Доказано ли положение? — доказано. 7.2 Является ли тривиальным? — нет. 7.3 Является ли новым? — да.
		7.1 Доказано ли положение?	
		1) доказано;	
		2) скорее доказано;	
		3) скорее не доказано;	
		4) не доказано;	
		5) в текущей формулировке проверить доказанность положения невозможно.	
		7.2 Является ли тривиальным?	

		1) да; 2) нет; 3) в текущей формулировке проверить тривиальность положения невозможно. 7.3 Является ли новым? 1) да; 2) нет; 3) в текущей формулировке проверить новизну положения невозможно. 7.4 Уровень для применения: 1) узкий; 2) средний; 3) широкий; 4) в текущей формулировке проверить уровень применения положения невозможно. 7.5 Доказано ли в статье? 1) да; 2) нет; 3) в текущей формулировке проверить доказанность положения в статье невозможно.	7.4 Уровень для применения — средний (молекулярная биология, диагностика). 7.5 Доказано ли в статье? — да. **Положение 2: Структурные параметры направляющих РНК, включая длину 46–47 нуклеотидов, таргетную область 23–24 нуклеотида и PAM-последовательность "TTTN", определяют высокую специфичность взаимодействия с ДНК-мишенью и эффективную работу эндонуклеаз MbCas12a и MeCas12a. Биохимические условия реакции — 2 мкМ crРНК, 1 мкМ Cas12a, температурный режим 37 °C и время инкубации 15–30 минут — обеспечивают формирование рибонуклеопротеинового комплекса и максимальную эндонуклеазную активность при расщеплении нуклеиновых кислот.** 7.1 Доказано ли положение? — доказано. 7.2 Является ли тривиальным? — нет. 7.3 Является ли новым? — да (параметры установлены впервые для данных ферментов). 7.4 Уровень для применения — средний (могут использоваться для разработки диагностических систем). 7.5 Доказано ли в статье? — да. **Положение 3: Функциональное значение каталитических доменов RuvC и Nuc в ферментах MbCas12a и MeCas12a подтверждено гомологичным моделированием и сайт-направленным мутагенезом. Критически важные аминокислотные остатки, в том числе в участках RuvC1, RuvC2, RuvC3 и Nuc, определяют активность фермента при расщеплении ДНК. Мутации в указанных позициях приводят к полной или частичной потере эндонуклеазной активности.** 7.1 Доказано ли положение? — доказано.

			7.2 Является ли тривиальным? — нет. 7.3 Является ли новым? — да (впервые показано для MbCas12a и MeCas12a). 7.4 Уровень для применения — узкий (актуально для фундаментальных исследований механизма действия ферментов). 7.5 Доказано ли в статье? — да. **Положение 4: Разработанный и экспериментально обоснованный способ молекулярной диагностики патогенов на основе эндонуклеазы MbCas12a в сочетании с изотермической амплификацией (LAMP, РПА), обеспечивает специфическое и чувствительное выявление ДНК-мишеней. Чувствительность диагностических систем достигает от 10^1 до 10^4 копий ДНК, что демонстрирует их практическую применимость для быстрой и полевой диагностики микробных и грибковых патогенов таких как *E. coli, S. aureus* и *Alternaria* spp.** 7.1 Доказано ли положение? — доказано. 7.2 Является ли тривиальным? — нет. 7.3 Является ли новым? — да (новые таргеты и адаптация фермента MbCas12a для диагностики). 7.4 Уровень для применения — широкий (возможность использования в ветеринарии, агробиотехнологиях, микробиологии). 7.5 Доказано ли в статье? — да.
8.	Принцип достоверности.	8.1 Выбор методологии - обоснован или методология достаточно подробно описана:	Методологическая база исследования тщательно проработана: применены современные молекулярно-биологические подходы (клональная экспрессия, сайт-направленный мутагенез, биохимическая верификация активности), а также методы анализа последовательностей и компьютерного моделирования.
	Достоверность источников и предоставляемой информации	**1) да;**	
		2) нет.	

		8.2 Результаты диссертационной работы получены с использованием современных методов научных исследований и методик обработки и интерпретации данных с применением компьютерных технологий:	В работе применены актуальные методы молекулярной биологии и диагностики (LAMP, РПА, *in vitro* тесты активности Cas-белков), а также методы биоинформатического анализа и структурного моделирования с использованием компьютерных программ.
		1) да;	
		2) нет.	
		8.3 Теоретические выводы, модели, выявленные взаимосвязи и закономерности доказаны и подтверждены экспериментальным исследованием (для направлений подготовки по педагогическим наукам результаты доказаны на основе педагогического эксперимента):	Теоретические выводы, модели и выявленные закономерности подтверждены экспериментальными исследованиями, включая разработку и апробацию молекулярно-диагностических подходов на основе MbCas12a. Достоверность обеспечена воспроизводимыми in vitro экспериментами, включающими структурно-функциональный анализ гомологов Cas12a, характеристику направляющих РНК и оценку функциональной роли каталитических доменов.
		1) да;	
		2) нет.	
		8.4 Важные утверждения **подтверждены**/частично подтверждены/не подтверждены ссылками на актуальную и достоверную научную литературу.	Важные положения и утверждения диссертационной работы подтверждены ссылками на современные и достоверные источники научной литературы, включая публикации в рецензируемых международных журналах по тематике CRISPR/Cas-систем и молекулярной диагностики.
		8.5 Использованные источники литературы **достаточны**/не достаточны для литературного обзора.	Использованные источники литературы являются достаточными для формирования обоснованного литературного обзора, охватывающего как фундаментальные исследования в области нуклеаз Cas12a, так и современные разработки диагностических методов.
9	Принцип практической ценности	9.1 Диссертация имеет теоретическое значение:	Диссертация имеет теоретическое значение, поскольку полученные результаты расширяют представления о структурно-функциональных характеристиках гомологов Cas12a, что вносит вклад в развитие фундаментальных основ молекулярной биологии и генной инженерии.
		1) да;	
		2) нет.	

		9.2 Диссертация имеет практическое значение и существует высокая вероятность применения полученных результатов на практике:	Диссертация обладает практическим значением, так как на основе проведённых исследований разработаны и апробированы методы молекулярной диагностики патогенов, применимые в ветеринарии, сельском хозяйстве и смежных областях. Высокая вероятность внедрения результатов подтверждается продемонстрированной чувствительностью и специфичностью диагностических систем.
		1) да;	
		2) нет.	
		9.3 Предложения для практики являются новыми:	Предложения для практики являются частично новыми, полностью новыми являются диагностические таргеты и применение MbCas12a в сочетании с изотермической амплификацией, в то время как ряд методических подходов основан на адаптации и модификации уже существующих решений.
		1) полностью новые;	
		2) частично новые (новыми являются 25-75%);	
		3) не новые (новыми являются менее 25%).	
10.	Качество написания и оформления	Качество академического письма:	Качество академического письма в диссертации оценивается как высокое. Текст изложен ясно, логично и в соответствии с нормами научного стиля.
		1) высокое;	
		2) среднее;	
		3) ниже среднего;	
		4) низкое.	
11.	Замечания к диссертации	1) Валидация предложенных диагностических систем проведена на ограниченном числе клинических и фитопатологических образцов. Для повышения убедительности практической значимости исследования можно было бы расширить выборку, включив большее количество образцов или разнообразие условий тестирования. 2) Разработанное автором устройство CRISPR-Kaz представляет интересное техническое решение. Вместе с тем в диссертации сравнительно кратко описаны его параметры и возможности. Дополнительное раскрытие характеристик, сравнение с существующими аналогами и обсуждение перспектив масштабирования усилили бы практическую ценность работы.	
12.	Научный уровень статей докторанта по теме исследования (в случае защиты диссертации в форме серии статей официальные рецензенты	Статьи докторанта опубликованы в высокорейтинговых рецензируемых журналах (Q1/Q2, WoS, Scopus), а также в изданиях, рекомендованных ККСОН. Опубликованы 7 работ: 3 статьи в журналах Q1/Q2 (WoS, Scopus), 3 статьи в республиканских изданиях, рекомендованных ККСОН, получен 1 патент. Научный уровень публикаций соответствует требованиям международных стандартов и подтверждает актуальность и новизну диссертационной работы.	

	комментируют научный уровень каждой статьи докторанта по теме исследования)	
13.	Решение официального рецензента (согласно пункту 28 настоящего Типового положения)	На основании проведённого анализа диссертационной работы, её теоретической значимости, практической ценности, новизны научных результатов, уровня самостоятельности соискателя и соответствия требованиям к диссертациям на соискание степени доктора философии (PhD), рекомендую присудить Шайзадиновой Айше Маратовне степень доктора философии (PhD).

Официальный рецензент:
кандидат ветеринарных наук, профессор,
Научно-исследовательский институт
прикладной биотехнологии
НАО «Костанайский региональный университет
имени Ахмет Байтұрсынұлы»

(подпись)

Рыщанова Раушан Миранбаевна

Р.М. Рыщанова қойылған
қолын куәландырамын
Ғалым хатшы М. Хасанова
Подпись Р.М. Рыщановой
заверяю
Ученый секретарь М. Хасанова

ҚОСТАНАЙ ӨҢІРЛІК УНИВЕРСИТЕТІ КОММЕРЦИЯЛЫҚ ЕМЕС АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ * АХМЕТ БАЙТҰРСЫНҰЛЫ АТЫНДАҒЫ ҚОСТАНАЙ ӨҢІРЛІК УНИВЕРСИТЕТІ КОММЕРЧЕСКОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО * РЕГИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АХМЕТ БАЙТУРСЫНОВА * ҒЫЛЫМИ ХАТШЫ УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ