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:	
		1) диссертация выполнена в рамках проекта или целевой программы, финансируемого(ой) из государственного бюджета (указать название и номер проекта или программы);	Исследования, положенные в основу диссертационной работы проведены в рамках приоритетного направления «Устойчивое развитие агропромышленного комплекса и безопасность сельскохозяйственной продук-ции», научно-технической прог-раммы BR10764944: «Разработка методов аналитического контроля и проведения мониторинга безопасности пищевой продукции» на 2021-2023 годы; в рамках проектов ГФ AP09259771 «Характеристика новых программируемых РНК-направляемых эндонуклеаз CRISPR/Cas систем для применения в диагностике»; AP19579275 «Разработка современной молекулярной диагностики патогенов сельскохозяйственных культур на основе метода CRISPR/Cas12a».

		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).	Диссертация соответствует приоритетным направлениям развития науки, утверждённым Высшей научно-технической комиссией при Правительстве Республики Казахстан. Работа включает в себя фундамен-тальные исследования в области молекулярной биологии с прикладными задачами в сфере сельского хозяйства, биобезопасности и биотехнологии, что делает её значимой как для науки, так и для практики.
2.	Важность для науки	Работа **вносит**/не вносит существенный вклад в науку, а ее важность **хорошо раскрыта**/не раскрыта.	Диссертационная работа вносит существенный вклад в развитие науки, так как посвящена исследованию новых программируемых эндонуклеаз CRISPR/Cas. Данное направление является одним из наиболее перспективных в современной биотехнологии, так как открывает широкие возможности для разработки быстрых и точных методов молекулярной диагностики. В работе показана не только актуальность данной тематики, но и её значимость для решения практических задач диагностики инфекционных заболеваний, мониторинга патогенов и

			обеспечения биобезопасности. Работа соединяет фундаментальные аспекты молекулярных исследований с прикладными направлениями.
3.	Принцип самостоятельности	Уровень самостоятельности:	Уровень самостоятельности автора оценивается как высокий и полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным исследованиям уровня PhD. В работе прослеживается личный вклад соискателя, экспериментальная и аналитическая работа выполнена лично диссертантом. Существенным подтверждением высокого уровня самостоятельности является участие Шайзадиновой А.М. в выполнении исследований в рамках финансируемых проектов и публикации научных статей, где соискатель выступает первым автором.
		1) высокий;	
		2) средний;	
		3) низкий;	
		4) самостоятельности нет.	
4.	Принцип внутреннего единства	4.1 Обоснование актуальности диссертации:	Актуальность диссертационной работы вполне обоснована. В работе изучены новые, ранее не описанные эндонуклеазы Cas12a, выделенные из *Moraxella bovis* и *Moraxella equi*. Учитывая возрастающее значение CRISPR/Cas-систем для диагностики в медицине и ветеринарии, изучение таких ферментов представляет
		1) обоснована;	
		2) частично обоснована;	
		3) не обоснована.	

			интерес и отвечает современным задачам биотехнологии. Выбор темы диссертации является своевременным и соответствует приоритетным направлениям исследований.
		4.2 Содержание диссертации отражает тему диссертации:	Содержание диссертационной работы соответствует заявленной теме исследования. В работе представлена характеристика новых эндонуклеаз Cas12a, выделенных из *Moraxella bovis* и *Moraxella equi*, ранее не описанных в научной литературе. Проведенные исследования направлены на изучение их структурно-функциональных характеристик, особенностей механизма действия и применения в молекулярной диагностике. Особое внимание уделено вопросу разработки диагностических систем на основе CRISPR/Cas12a, что подчеркивает практическую значимость исследования. Таким образом, содержание работы охватывает как теоретические, так и прикладные аспекты, что демонстрирует целостность подхода и соответствие выполненного исследования основной теме диссертации.
		1) отражает;	
		2) частично отражает;	
		3) не отражает.	

		4.3. Цель и задачи соответствуют теме диссертации:	Цель и задачи соответствует заявленной теме исследования. Цель исследования предусматривает характеристику новых программируемых РНК-направляемых эндонуклеаз CRISPR/Cas и использование данных систем для точной идентификации участков ДНК патогенов в молекулярной диагностике. Поставленные задачи полностью соответствуют указанной цели. В диссертации описаны следующие результаты: получение и структурно-функциональное исследование рекомбинантных эндонуклеаз Cas12a из *Moraxella bovis* и *Moraxella equi*; дизайн направляющих РНК; определение оптимальных последователь-ностей PAM; формирование рибонуклеопротеинового комплекса и оптимизация его функционирования in vitro; проведение гомологичного моделирования и анализ мутантных форм ферментов для идентификации активного центра; разработка диагностических систем на основе LAMP/CRISPR-Cas12a и RPA/CRISPR-Cas12a.
		1) соответствуют;	
		2) частично соответствуют;	
		3) не соответствуют.	
		4.4 Все разделы и положения диссертации логически взаимосвязаны:	Все разделы и положения диссертации полностью взаимосвязаны

		1) полностью взаимосвязаны;	и подчинены общей логике исследования.
		2) взаимосвязь частичная;	
		3) взаимосвязь отсутствует.	
		4.5 Предложенные автором новые решения (принципы, методы) аргументированы и оценены по сравнению с известными решениями:	Проведённый критический анализ продемонстрировал, что выявленные особенности новых эндонуклеаз позволяют расширить представления о функциональном разнообразии Cas12a и дают основания для их применения в разработке диагностических систем. Проведено сравнение с гомологичными белками.
		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?	Научная новизна диссертации носит частичный характер. К числу новых результатов относятся характеристика ранее не описанных аналогов Cas12a из *Moraxella bovis* и *Moraxella equi*, изучение их нуклеазной активности в комплексе с направляющими crРНК, а также уточнение условий экспрессии и очистки данных ферментов. Вместе с тем, часть положений диссертации опирается на уже известные научные разработки в области использования CRISPR/Cas-систем для молекулярной диагностики, включая использование методов изотермической амплификации. Новыми в данном направлении являются отдельные
		1) полностью новые;	
		2) частично новые (новыми являются 25-75%);	
		3) не новые (новыми являются менее 25%).	

			целевые мишени для детекции патогенов и экспериментальная апробация диагностических систем на основе MbCas12a и MeCas12a. Таким образом, научные результаты характеризуются как частично новые, при этом доля новых данных оценивается в пределах 75%.
		5.2 Выводы диссертации являются новыми?	Выводы носят частично новый характер в соответствии с результатами и оцениваются в пределах 75%.
		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 диссертационной работе обоснованы и реализованы технические решения, заключающиеся в получении и характеристике новых эндонуклеаз MbCas12a и MeCas12a, а также определении дополнительных диагностических мишеней. Разработанные технологические решения включают оптимизированные протоколы экспрессии, очистки и применения ферментов в системах молекулярной диагностики, основанных на комбинации CRISPR-Cas12a с изотермическими методами амплификации (LAMP, РПА). Экономическая эффективность подтверждается снижением себестоимости анализа при сохранении высокой чув-
		1) полностью новые;	
		2) частично новые (новыми являются 25-75%);	
		3) не новые (новыми являются менее 25%).	

			ствительности и специфичности по сравнению с существующими аналогами. Управленческая составляющая выражается в предложении по практическому применению разработанных систем для организации диагностики и мониторинга патогенов в полевых условиях. В совокупности данные решения оцениваются как частично новые, их доля составляет более 60%.
6.	Обоснованность основных выводов	Все основные выводы **основаны**/не основаны на весомых с научной точки зрения доказательствах либо достаточно хорошо обоснованы (для qualitativeresearch (куолитативресеч) и направлений подготовки по искусству и гуманитарным наукам).	Все основные выводы диссертационной работы основаны на весомых с научной точки зрения доказательствах. Результаты подтверждены комплексом экспериментальных данных, полученных с применением современных методов молекулярной биологии, биохимии, генной инженерии и биоинформатики. Использование различных подходов от экспрессии и очистки рекомбинантных белков до структурно-функционального анализа и моделирования позволило обеспечить надежность и воспроизводимость результатов. Выводы согласуются с поставленными целями и задачами исследования, логически вытекают из представленных экспериментальных дан-

			ных и обоснованы статистическим и сравнительным анализом. Кроме того, разработана НТД (Стандарт организации; Наставление по применению; Инструкция по изготовлению) на производство и применение набора для исследования молока коров при бактериальных инфекциях на территории Республики Казахстан
7.	Основные положения, выносимые на защиту	Необходимо ответить на следующие вопросы по каждому положению в отдельности:	Представлено 4 основных положения диссертации, выносимых на защиту. Положение 1. Положение доказано экспериментальными результатами, подтверждающими функциональную активность рекомбинантных белков MbCas12a и MeCas12a. Тривиаль-ным не является. Новое, так как подобные аналоги Cas12a из *Moraxella* ранее не описаны. Уровень применения – средний (в рамках фундаментальных и прикладных исследований CRISPR-систем). Доказано в статье. Положение 2. Положение доказано серией биохимических экспериментов, подтвердивших роль структурных параметров crРНК и PAM в активности ферментов.
		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.	Тривиальным не является. Новое, поскольку выявленные параметры уточняют механизмы функционирования Cas12a. Уровень применения – средний. Доказано в статье. Положение 3. Положение доказано результатами гомологичного моделирования и сайт-направленного мутагенеза, показавшими функциональное значение доменов RuvC и Nuc. Тривиальным не является. Новое, так как аналогичные исследования для MbCas12a и MeCas12a не проводились. Уровень применения – узкий (специализированные исследования ферментов). Доказано в статье. Положение 4. Положение доказано разработкой и экспериментальной проверкой диагностической системы с использованием MbCas12a в сочетании с LAMP и РПА. Тривиальным не является. Новое, так как предложена практическая схема диагностики с подтверждённой высокой чувствительностью. Уровень применения – широкий (лабораторные и полевые диагностические исследования). Доказано в статье.

8.	Принцип достоверности.	8.1 Выбор методологии - обоснован или методология достаточно подробно описана:	Выбор методологической базы исследования является обоснованным и соответствует современным стандартам выполнения диссертационных работ в области молекулярной биологии и биотехнологии. В работе подробно описаны применяемые подходы: методы амплификации ДНК, клонирования, трансформации, экспрессии и очистки белков, сайт-направленного мутагенеза, а также методы биоинформатического анализа и структурного 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:	Все представленные сведения основаны на результатах собственных экспериментов автора и сопоставлены с данными современной научной литературы, что исключает недостоверность или искажение информации. Результаты диссертационной работы получены с использованием современных методов молекулярной биологии, биохимии и генной инженерии, а также актуальных инструментов компьютерного анализа. Применение программных средств визуализации, моделирования структур и анализа последовательностей обеспечивает высокую точность интерпретации
		1) да;	
		2) нет.	

			экспериментальных данных и их соответствие мировому уровню исследований.
		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 положения работы, включая характеристику новых аналогов Cas12a, структурные параметры направляющих РНК, функциональную роль каталитических доменов, а также разработку и применение диагностических систем на основе MbCas12a и MeCas12a, подтверждены результатами экспериментальных исследований.
		1) да;	
		2) нет.	
		8.4 Важные утверждения подтверждены/частично подтверждены/не подтверждены ссылками на актуальную и достоверную научную литературу.	Основные положения и выводы диссертации подтверждены ссылками на современные и достоверные источники научной литературы, преимущественно опубликованные в рецензируемых журналах по проблематике CRISPR/Cas-систем. Это обеспечивает актуальность, корректность и научную обоснованность представленных данных. Отдельные ключевые утверждения опираются на оригинальные результаты автора, что подчёркивает новизну исследования и снижает степень компилятивности обзора.
		8.5 Использованные источники литературы достаточны/не достаточны для литературного обзора.	Список литературы включает 162 источника и является вполне достаточным для формирования

			всестороннего литературного обзора. В нём представлены как фундаментальные работы по механизму действия CRISPR/Cas-систем, так и последние исследования по применению Cas12a в молекулярной диагностике. Такой подбор источников обеспечивает полноту и объективность анализа предшествующих результатов и демонстрирует корректное позиционирование авторского исследования в научном контексте.
9	Принцип практической ценности	9.1 Диссертация имеет теоретическое значение:	Работа имеет теоретическое значением, поскольку в ней впервые охарактеризованы новые аналоги Cas12a (MbCas12a и MeCas12a), определены их структурные и функциональные особенности, включая параметры направляющих РНК и критические домены ферментов. Полученные данные расширяют фундаментальные представления о разнообразии и механизмах действия CRISPR/Cas-систем.
		1) да;	
		2) нет.	
		9.2 Диссертация имеет практическое значение и существует высокая вероятность применения полученных результатов на практике:	Практическая значимость определяется разработкой диагностических систем на основе новых эндонуклеаз Cas12a в комбинации с изотермической амплификацией (LAMP, РПА). Показана высокая чувствительность и спе-
		1) да;	
		2) нет.	

			цифичность методов, что обеспечивает возможность их использования для быстрого выявления возбудителей бактериальных и грибковых болезней в полевых условиях. Высокая вероятность практического внедрения результатов подтверждается полученными данными о воспроизводимости и экономической целесообразности предложенного подхода.
		9.3 Предложения для практики являются новыми:	Частично новые (новыми являются около 50–60%). Новизна заключается в применении ранее не изученных аналогов Cas12a и разработке на их основе диагностических методов с оптимизированными условиями реакций. В то же время часть подходов (использование изотермической амплификации в комбинации с CRISPR/Cas) имеет предшествующие аналоги в литературе, что определяет частичный характер новизны.
		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:	Текст диссертации отличается строгим стилем, логичностью построения, полнотой изложения и корректным использованием научной терминологии. Структура и аргументация соответствуют требованиям к академическим
		1) высокое;	
		2) среднее;	
		3) ниже среднего;	
		4) низкое.	

			исследованиям.
11.	Замечания к диссертации	1) В работе ген Cas12a из *Moraxella equi* представлен в виде синтетической кодон-оптимизированной последовательности, тогда как Cas12a из *Moraxella bovis* использован в нативном варианте без оптимизации. Вопрос, чем обусловлено различие в подходах? Возможно ли влияние данного фактора на уровень экспрессии и функциональную активность белков? 2) В работе подробно охарактеризованы MbCas12a и MeCas12a, однако отсутствует прямое сопоставление их активности и специфичности с другими известными эндонуклеазами семейства Cas12a (например, LbCas12a, AsCas12a). Включение такого сравнения позволило бы более полно показать преимущества новых ферментов и подчеркнуть их уникальные свойства. 3) В целом, диссертация написана очень грамотно, однако встречаются неудачные выражения и пунктуационные ошибки, которые не снижают ее ценность.
12.	Научный уровень статей докторанта по теме исследования (в случае защиты диссертации в форме серии статей официальные рецензенты комментируют научный уровень каждой статьи докторанта по теме исследования)	Научный уровень статей докторанта по теме исследования высокий. Статьи автора, опубликованные в рецензируемых журналах с высоким импакт-фактором, отражают основные результаты диссертации и подтверждают её значимость. Основные результаты диссертации отражены в 7 публикациях: 3 статьи опубликованы в журналах базы *WoS* (Q1/Q2) и *Scopus* (процентиль выше 50), 3 статьи в изданиях, рекомендованных ККСОН, получен 1 патент и разработана НТД на производство и применение диагностического набора. Публикации подтверждают новизну, значимость и прикладную ценность работы.
13.	Решение официального рецензента (согласно пункту 28 настоящего Типового положения)	Рекомендую присудить степень доктора философии (PhD) Шайзадиновой Айше Маратовне.

Официальный рецензент:
кандидат биологических наук,
профессор кафедры микробиологии и биотехнологии,
НАО «Казахский агротехнический
исследовательский университет им. С. Сейфуллина»

"С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті" коммерциялық емес акционерлік қоғамы
Боровиков Сергей Николаевич
қолын растаймын:
Ғалым - хатшы