Отзыв официального оппонента
о диссертации Мещаниновой Марии Ивановны
«Подходы к твердофазному синтезу конъюгатов олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов как эффективных инструментов молекулярно-биологических исследований»,
представленной на соискание ученой степени
доктора химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия

Актуальность диссертационного исследования

Диссертационная работа Мещаниновой М.И. посвящена решению важной научной задачи: разработке подходов к высокоэффективному синтезу олигорибонуклеотидов и их конъюгатов с функциональными молекулами. Актуальность работы не вызывает сомнений, поскольку потребность в создании новых молекулярных инструментов на основе синтетических олигонуклеотидов постоянно растет. Без них невозможно представить фундаментальные исследования в молекулярной биологии и генетике, современные технологии молекулярной диагностики и терапии. Значительная часть работ в химии нуклеиновых кислот направлена на создание неканонических молекулярных структур и аналогов, обладающих определенными физико-химическими характеристиками и предназначенных для решения конкретных задач. Модифицированные олигонуклеотиды значительно расширяют традиционные области применения синтетических ДНК и РНК, позволяя проводить манипуляции, не протекающие в системах *in vivo*. В последнее время очень активно ведутся работы по созданию фармацевтических препаратов на основе олигорибонуклеотидов, используемых в терапии ряда социально значимых заболеваний.

Методология синтеза олигорибонуклеотидов долгое время оставалась "на втором плане", что привело к некоторому ее отставанию от таковой для олигодезоксирибонуклеотидов. Кроме того, существующие подходы к пре-синтетическому и пост-синтетическому получению конъюгатов олигорибонуклеотидов имеют существенные ограничения: необходимость использования коммерчески доступных модификаторов, многостадийность, трудности масштабирования и очистки. В связи с этим разработка новых твердофазных стратегий, позволяющих вводить функциональные молекулы различной природы в состав конъюгатов непосредственно на носителе, представляет собой важную и своевременно поставленную научную задачу. Исследования Мещаниновой М.И. способствуют заметному прогрессу в химии синтетических нуклеиновых кислот, а их практическую значимость трудно переоценить.

Общая характеристика и содержание диссертации

Диссертационная работа оформлена по традиционной схеме. Она изложена на 231 странице, содержит 112 рисунков, 11 таблиц. Работа состоит из введения, списка сокращений и терминов, трех глав: обзора литературы (глава 1), результатов и их обсуждения (глава 2), материалов и методов (глава 3), заключения, выводов, списков цитированной литературы (547 источников) и работ, в которых изложены основные результаты диссертации.

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы ее цель и задачи, отмечены научная новизна и практическая значимость полученных результатов, приведены основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы изложен на 58 страницах. Он в полной мере отражает современные достижения в области химического синтеза модифицированных олигонуклеотидов и их аналогов. Обзор предваряется общими, но необходимыми сведениями о принципах химического синтеза олигонуклеотидов, далее рассмотрены пре-синтетический и пост-синтетический подходы к получению конъюгатов олигонуклеотидов с функциональными молекулами. Обзор достаточно информативен, изобилует химическими структурами модификаторов и схемами превращений, отличается полнотой и критическим анализом.

Во второй главе излагаются научные достижения диссертанта. Глава начинается с описания результатов работы по оптимизации протоколов синтеза олигорибонуклеотидов и их структурных по углеводо-фосфатному остову аналогов как средней длины, так и протяженных (до 100 и более звеньев). Далее в подразделах 2.2-2.5 детально обсуждены подходы к конъюгации олигорибонуклеотидов с конкретными функциональными молекулами. В каждом из этих подразделов ставится соответствующая задача и далее приводится ее решение через обсуждение стратегии синтеза, оптимизацию условий и характеристику полученных соединений. Данные подразделы, на мой взгляд, содержат наиболее интересные, оригинальные, практически значимые результаты, полученные диссертантом. Завершается вторая глава описанием использования полученных олигонуклеотидных конструкций другими научными группами.

В третьей главе приводится перечень использованных реагентов и подробное описание методик синтеза соединений-модификаторов, олигонуклеотидов и их конъюгатов, методов анализа продуктов реакций (ТСХ, ВЭЖХ, гель-электрофорез, ЯМР, масс-спектрометрия и др.). Экспериментальная часть изложена очень подробно и доступно для воспроизведения соответствующих методик. Несомненную ценность представляют приведенные расшифровки ЯМР-спектров и ряд физико-химических характеристик органических соединений-модификаторов.

Выводы сформулированы достаточно четко и соответствуют поставленным задачам.

Научная новизна и практическая значимость

Результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, характеризуются высокой степенью научной новизны. Мещаниновой М.И. разработан ряд оригинальных подходов к твердофазному получению 5'-конъюгатов олигорибонуклеотидов. Так, предложен способ введения функциональных молекул, основанный на сочетании Н-фосфонатной и фосфитамидной химии. Разработаны твердофазные варианты синтеза конъюгатов через кислотолабильные гидразоновую и фосфамидную связи. Интересным является подход с использованием N,N'-дисукцинимидилкарбоната в качестве активирующего агента для конъюгации олигорибонуклеотидов с соответствующими аминопроизводными. Оптимизированы протоколы синтеза протяженных олигорибонуклеотидов, что крайне актуально в связи с необходимостью получения, например, гидовых РНК. Высокая практическая значимость работы подтверждается тестированием соответствующих конъюгатов и их структурных аналогов в экспериментальных исследованиях другими научными группами, в большинстве случаев проявивших требуемое биологическое свойство. Нет сомнений, что предложенные Мещаниновой М.И. способы получения 5′-конъюгатов олигорибонуклеотидов и их аналогов, а также протоколы синтеза протяженных олигорибонуклеотидов найдут широкое практическое применение.

Достоверность и обоснованность результатов

Работа выполнена на современном методологическом уровне. Для выделения, очистки, идентификации соединений использованы тонкослойная и высокоэффективная жидкостная хроматография, аналитический и препаративный гель-электрофорез; структуры установлены с помощью ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии, соответствующие первичные данные приведены непосредственно в тексте диссертации. Свойства конъюгатов олигорибонуклеотидов с функциональными молекулами (температура плавления дуплексов, стабильность гидразоновой и фосфамидной связей при различных pH) исследованы с использованием адекватных методик.

Хочется отметить внимательность и требовательность к качеству работы, проявленные диссертантом при отработке отдельных этапов синтеза: подборе оптимальных условий удаления бутилоксикарбонильной защиты, твердофазного синтеза конъюгатов с 4-метоксибензойной, фолиевой и глицирретиновой кислотами и др. Это свидетельствует о высокой квалификации автора и глубоком понимании химии нуклеиновых кислот.

Основные результаты диссертационной работы отражены в 28 статьях в высокорейтинговых журналах, представлены в виде устных докладов на многочисленных российских и зарубежных научных мероприятиях. Достоверность полученных научных результатов не вызывает сомнений.

Замечания и вопросы по диссертации

При ознакомлении с диссертационной работой возник ряд вопросов и замечаний. Так, по следующим вопросам хотелось бы получить развернутые ответы:

1. На странице 114 указано, что "… в реакционной смеси помимо полосы, соответствующей целевому 5'-аминопроизводному олигонуклеотида…, присутствует продукт с большей электрофоретической подвижностью. Было сделано предположение, что это 5',5'-димерный продукт сшивки двух олигонуклеотидов посредством диамина". Возможно ли увеличение электрофоретической подвижности для олигонуклеотида удвоенной длины, или здесь присутствует опечатка?
2. На странице 118 указано, что "… карбоксильную группу активировали с использованием как эквимолярных количеств, так и двукратного избытка или недостатка дициклогексикарбодиимида (DCC) и гидроксибензотриазола (HOBt) относительно каждой кислоты". С какой целью использовали недостаток конденсирующих агентов и к чему это привело?
3. На странице 127 указано, что "в ряде случаев при проведении масс-анализа происходит деструкция P-N-связи". В каких случаях это происходило и с чем это может быть связано?
4. В работе предложено несколько альтернативных подходов к 5'-конъюгации. Хотелось бы услышать от диссертанта сравнительную оценку этих подходов: в отношении каких типов функциональных молекул и олигонуклеотидов каждый из подходов является более предпочтительным. Существуют ли какие-либо ограничения их использования?
5. Одним из преимуществ твердофазного синтеза является возможность автоматизации и масштабирования. Проводилась ли оценка возможности автоматизации предложенных подходов путем их реализации в ДНК-синтезаторе?

6. В тексте диссертации используются термины и названия "конъюгирование" и "конъюгация", "холестерин" и "холестерол". Хотелось бы узнать: используются ли они как равнозначные? Если да, то почему диссертант не придерживался единого стиля написания?

В качестве мелких замечаний отмечу следующие:

- В тексте диссертации присутствуют неудачные фразы и неточные формулировки, например, "гидродинамический размер лекарств", "создан набор подходов", "термическая стабильность siРНК", "…получить с одного реактора 0.05-0.15 микромоль реакционной смеси…", а также опечатки, например, "гиперлидемия", "molecular serve" вместо "molecular sieves", и ряд других.
- Ссылки на рисунки 2.1.2. и 2.4.3 в тексте не совпадают с номерами соответствующих рисунков.
- Предложение, поясняющее понятие температуры плавления дуплексов, сложно сформулировано и излишне (страница 97, строки 3-5 сверху).
- На страницах 105-106 в изложении материала наблюдается неожиданный переход от описания модельных олиготимидилатов к siРНК; обоснование перехода к siРНК отсутствует.
- В тексте диссертации нет четкого указания на то, что синтез конъюгатов/ввод модификаций осуществляли вне ДНК-синтезатора. Также нет указания на то, каким методом получены данные для построения кинетических кривых расщепления (гидролиза) модифицированных олигорибонуклеотидов. Об этом можно узнать из главы 3, однако такое упоминание в главе 2 было бы полезным и облегчило бы восприятие материала.

Отдельно хотелось бы выделить следующие замечания:

- В обсуждении (глава 2) не хватает обобщающего анализа полученных результатов. На мой взгляд, в самом начале главы 2 можно было привести схему, в общих чертах отражающую экспериментальный дизайн/логику исследования и объединяющую разные блоки работы. В завершении главы было бы полезным дать сводную информацию, например, по выходам целевых продуктов, привести сравнение использованных синтетических подходов между собой, дав рекомендации о предпочтительности того или иного способа синтеза с учетом временных и материальных затрат, устойчивости конъюгатов и пр.
- По всему тексту недостаточно четко разделены собственные результаты и результаты других авторов. Диссертант избегает в тексте притяжательных местоимений и слов. Например, фраза "в нашей/данной/представленной работе" практически не встречается, в то время как фраза "в работе" встречается около 30 раз, в том числе при упоминании сторонних авторов. На мой взгляд, диссертант поскромничал и не подчеркнул принадлежность себе весьма значимых научных достижений.

Однако вышеприведенные вопросы и замечания не затрагивают существа защищаемых положений, носят уточняющий и отчасти технический характер и не снижают общей высокой оценки работы.

Заключение

Диссертационная работа Мещаниновой Марии Ивановны «Подходы к твердофазному синтезу конъюгатов олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов как эффективных инструментов молекулярно-биологических исследований» выполнена на высоком научном уровне, является завершенной научно-квалификационной работой, совокупность результатов которой вносит существенный вклад в раздел биоорганической химии, касающийся синтетических нуклеиновых кислот. Диссертационная работа по объему, качеству выполнения, актуальности полученных результатов полностью соответствует требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертационная работа оформлена в соответствии с Положениями о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Мещанинова Мария Ивановна, заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия.

Гарафутдинов Равиль Ринатович

доктор химических наук
специальность 1.5.4 - Биохимия
кандидат биологических наук
специальность 03.00.03 - Молекулярная биология

ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией
структуры и функций биополимеров ИБГ УФИЦ РАН

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
(ИБГ УФИЦ РАН)
450054, г. Уфа, пр. Октября, 71
тел. +7 (347) 2356088
электронная почта: garafutdinovr@mail.ru

25 ноября 2026 г.

Подпись Гарафутдинова Р.Р. заверяю

Ученый секретарь ИБГ УФИЦ РАН
д.б.н. М.А. Бермишева

ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ