

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Чиглинцевой Дарьи Александровны  
**«МикроРНК-направленные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты  
(миРНКазы): каталитические свойства и противоопухолевая активность»**,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности 1.5.4 - биохимия

Актуальность терапии, нацеленной на РНК, особенно микроРНК (миРНК), обусловлена их ключевой ролью в патогенезе целого ряда заболеваний. Дисрегуляция РНК лежит в основе многих онкологических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и инфекционных болезней, приводя к нарушению гомеостаза клеток и дальнейшим патологическим изменениям.

МикроРНК (миРНК) регулируют экспрессию не менее половины генов человека, контролируя трансляцию и деградацию мРНК. Их дисбаланс провоцирует глобальную реорганизацию клеточных процессов, включая канцерогенез: онкогенные миРНК усиливают пролиферацию, а снижение онкосупрессорных способствует злокачественной трансформации. В онкологии миРНК служат диагностическими маркерами и мишенями для точной терапии.

Традиционные методы (химио- и иммунотерапия) имеют побочные эффекты, в том числе резистентность к терапии, а рост заболеваемости раком требует новых стратегий. Диссертационная работа Чиглинцевой Д.А. посвящена разработке и изучению свойств искусственных рибонуклеаз, миРНКаз, которые адресно воздействуют на миРНК. Диссертантом были созданы и протестированы в системах *in vitro* и *in vivo* четыре типа конструкций: двойные, петлеобразующие, крабоподобные и вилкоподобные конъюгаты, различающиеся способом связывания с мишенью. Автор показала, что разработанные соединения эффективно снижают уровень онкогенных миРНК (на примерах миРНК-21, миРНК-17) как в клеточных культурах, так и мышинных опухолевых моделях, при этом обеспечивают необратимую инактивацию мишеней через каталитическое расщепление.

Разработка новых подходов к терапии онкозаболеваний посредством эффективного снижения уровня онко-значимых миРНК, безусловно, чрезвычайно важна. Таким образом, тема диссертационной работы Чиглинцевой Дарьи Александровны, несомненно, является **актуальной** для научно-технического развития в данной области знаний и соответствует тенденциям развития мировой науки.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа Чиглинцевой Д.А. «МикроРНК-направленные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты (миРНКазы): каталитические свойства и противоопухолевая активность» написана в соответствии с традиционным планом и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе методов, результатов собственных исследований и обсуждения этих результатов, а также содержит обобщающее заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 335 источников. Работа изложена на 179 страницах печатного текста и проиллюстрирована 6 таблицами и 56 рисунками.

**Введение** раскрывает актуальность выбранной темы, включает формулировку целей и задач исследований, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, основные положения, выносимые на защиту, информацию о личном вкладе автора в представленную работу. В этой главе сформулированы принципы создания сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз, нацеленных на зрелые микроРНК, и отмечены их преимущества перед другими подходами, использующими антисмысловые олигонуклеотиды.

### **Обзор литературы**

Во вводной части автор рассматривает эволюцию методов терапевтического воздействия на транскриптом — от классических антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) до гибридных конструкций с собственной каталитической активностью.

Далее последовательно рассмотрены природные ферменты, обладающие РНКазной активностью. (1) Ключевой фермент РНКазы H1: подробно описана структура и механизм действия РНКазы H1, проанализированы кинетические параметры деградации РНК-мишеней и роль вспомогательных белков, модулирующих активность фермента, систематизированы современные химические модификации (PS, FANA,  $\mu$ -модификации и др.), позволяющие повысить стабильность АСО без потери способности рекрутировать РНКазу H1. (2) Другие ферментативные системы, проявляющие РНКазную активность, Рассмотрен подход с использованием РНКазы Р и белков семейства Argonaute (AGO) и PIWI в РНК-интерференции.

Последний раздел литературного обзора посвящен сиквенс-специфическим искусственным рибонуклеазам, обладающим автономной каталитической активностью. Подчеркивается их преимущество, способность к многооборотному расщеплению мишени без участия эндогенных ферментов.

Обзор демонстрирует глубокую эрудицию автора. Анализ литературы проведен на высоком уровне, охватывает ключевые аспекты темы с обширной библиографией (более

270 источников), прекрасно иллюстрирован, свидетельствует о высокой квалификации диссертанта и подготавливает читателя к восприятию результатов работы.

В главе «Экспериментальная часть» приведены методы исследования, используемые в работе. Впечатляет разнообразие методов - от классических молекулярно-биологических исследований *in vitro* до работы с культурами клеток и животными. Все методики написаны подробно, с экспериментальными деталями, что предполагает их воспроизведение. Тщательность описания может служить дополнительным подтверждением высокого методического уровня представленной работы.

### Результаты и обсуждение

Глава, посвященная результатам диссертанта, начинается с краткого исторического обоснования выбора типа искусственных РНКаз для изучения, а именно, выбора каталитической группы, представляющей собой пептид на основе аргинина и лизина. Далее представлены четыре типа олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, двойные (DC), петлеобразующие (BC), крабоподобные (CC) и вилкоподобные (FC). Диссертант последовательно описывает все этапы их создания: подбор длины и положения относительно мишени адресной компоненты, варианты прикрепления пептидной части/двух пептидных частей, исследование гибридизационных свойств, каталитической активности и нуклеотидной специфичности конъюгатов, в том числе в присутствии РНКазы H1. Результатом этого комплексного исследования стал выбор миРНКаз с наибольшей каталитической активностью, а также наиболее выраженным синэргическим эффектом с РНКазой H1. Также, еще раз хочу отметить высочайший экспериментальный и методический уровень этой части работы.

Для дальнейшего тестирования в *in vitro* и *in vivo* моделях были выбраны CC и FC конъюгаты, нацеленные на клинически значимые онкогенные микроРНК миРНК-17 и миРНК-21. Для оценки биологической активности выбранных миРНКаз на клеточных линиях *in vitro* определяли эффективность разрушения мишени, специфичность действия миРНКазы, уровень синтеза белков, регулируемых миРНК-21 и миРНК-17, а также влияние на процессы пролиферации, инвазии и миграции клеток. Было продемонстрировано, что разработанные миРНКазы сопоставимы и даже превосходят по эффективности разрабатываемые в мире ингибиторы микроРНК, в том числе и с РНКазной активностью.

Способность CC и FC антимиРНК-21 миРНКаз ингибировать рост опухоли была исследована на мышинных ксенографтных моделях аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7) и эпидермоидной аденокарциномы человека (KB-8-5), показана прямая зависимость между эффективностью расщепления миРНК-мишени и замедлением роста опухоли. Разработанные миРНКазы проявляли терапевтический противоопухолевый

потенциал очень специфично, без токсического действия на другие органы. Также следует отметить, что были использованы низкие дозы миРНКаз, что связано с показанной диссертантом свойством многооборотности.

Завершает диссертацию раздел **Заключение**, в котором суммированы полученные данные о разработанных искусственных РНКазах, нацеленных на микроРНК. Предложена элегантная схема механизма действия.

Выводы объективно отражают суть представленных исследований и соответствуют поставленным экспериментальным задачам

### **Новизна**

Впервые проведено систематическое сравнение четырех типов конструкций олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, обладающих РНКазной активностью (двойных, петлеобразующих, крабоподобных и вилкоподобных), что позволило выявить и предложить их оптимальный дизайн. Установлено, что введение именно двух пептидов (LRLRG)<sub>2</sub> в конъюгат многократно ускоряет расщепление мишени, при этом решающее значение имеет их пространственное расположение. Диссертант впервые показал, что искусственные миРНКазы действуют в синергии с природным ферментом РНКазой Н1, обеспечивая глубокую деградацию миРНК по всем её участкам. Продемонстрирована прямая связь между скоростью расщепления миРНК и торможением роста опухоли у мышей.

### **Критические замечания**

В работе нет существенных недостатков. Присутствует небольшое количество редакторских недочетов, опечаток (например, рисунок 56 назван 53) и англицизмов «композиция буферной среды», стр 108).

Можно высказать следующие пожелания для обсуждения:

1. В разделе 3.4 описан синергизм действия миРНКаз с РНКазой Н1. Как Вы считаете, не возникает ли между ними конкуренции за субстрат (миРНК), и каким образом удастся достичь именно повышения скорости расщепления, а не взаимного ингибирования?

2. Несмотря на детальный анализ всех четырех типов миРНКаз, в итоговом обсуждении нет четкости, в каких клинических ситуациях предпочтительнее использовать «крабоподобные», а в каких — «вилкоподобные» конструкции.

3. Автором показано значительное снижение уровня миРНК-21 и миРНК-17 под действием созданных специфических миРНКаз. Насколько универсален предложенный дизайн для создания препаратов против других некодирующих РНК, в частности, длинных некодирующих РНК?

4. Также в работе определению биологической активности конъюгатов на мышинных опухолевых моделях отсутствует единообразие экспериментов. Так, для минимизации ограничений, связанных с эффективностью доставки крабоподобных миРНКаз, опухолевые клетки MCF-7 обрабатывали соединениями перед имплантированием мышам, а в случае вилоподобных вводили препарат в уже сформировавшуюся опухоль, что может затруднять проведение сравнения свойств этих соединений.

К этой части работы также относится следующий вопрос: предварительная трансфекция антимиРНК-21 СС в MCF-7 проводилась в течение 4 часов, что достаточно для стартового разрушения мишени. Насколько опухоль, сформированная клетками, обработанными миРНКазой, может отличаться от опухоли, сформированной клетками, обработанными контрольным конъюгатом (scramble)?

Высказанные выше соображения никаким образом не умаляют высокий уровень этой работы.

#### **Достоверность и обоснованность результатов**

Большой объем экспериментального материала, высокий научно-методический уровень исследования и тщательный анализ полученных данных обеспечивают достоверность полученных данных и обоснованность сделанных выводов.

Полученные автором результаты могут быть использованы в фундаментальных исследованиях во многих научно-исследовательских институтах молекулярно-биологического и медико-биологического направлений, а также иметь практическое применение в разработке новых средств терапии рака.

#### **Заключение**

Диссертационная работа Чиглинцевой Дарьи Александровны «МикроРНК-направленные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты (миРНКазы): каталитические свойства и противоопухолевая активность» представляет собой законченное оригинальное научное исследование, выполненное на высоком методическом уровне.

Работа решает важную научно-практическую задачу — создание инновационных инструментов адресной инактивации онкогенных миРНК. Автором впервые разработаны и систематизированы новые структурные типы искусственных рибонуклеаз (миРНКаз), выявлен эффект их синергического взаимодействия с эндогенной РНКазой H1 и установлена прямая корреляция между каталитической активностью конъюгатов и их противоопухолевым эффектом *in vivo*. Полученные данные закладывают фундамент для разработки нового класса высокоселективных противоопухолевых препаратов на основе миРНКаз, способных эффективно подавлять рост опухолей (до 85% в экспериментах *in vivo*).

Выводы базируются на обширном экспериментальном материале, полученном с использованием современных методов биохимии и молекулярной биологии.

Основные результаты работы опубликованы в 4 статьях в высокорейтинговых международных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus (Molecules, IJMS, Biomaterials, Biomolecules), и представлены на 12 конференциях.

Содержание и оформление автореферата полностью отражает основные положения диссертации.

Таким образом, диссертация Чиглинцевой Дарьи Александровны является законченным исследованием, которое по своему содержанию, актуальности выбранной темы, научной новизне, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности полученных результатов, их научной и практической значимости в полной мере соответствует требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями №5 и №6 Положения о диссертационных советах в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а ее автор, Чиглинцева Д.А., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 - биохимия.

доктор биологических наук

31.03.2026

Ажикина Татьяна Леодоровна

Зав. лабораторией регуляторной транскриптомики  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт  
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук (ИБХ РАН)  
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
tatazhik@ibch.ru  
8 (495) 330-6992

Подпись Ажикиной Т.Л. «заверено»  
Ученый секретарь ФГБУН ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
доктор физико-математических наук



6

Олейников В.А.