

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента на диссертационную работу

**Чиглинцевой Дарьи Александровны**

**«МикроРНК-направленные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты (миРНКазы):**

**каталитические свойства и противоопухолевая активность»,**

представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия

### **Актуальность темы исследования.**

Подход к направленному воздействию на выбранные участки определенных нуклеиновых кислот, основанный на применении реакционноспособных производных синтетических олигонуклеотидов, комплементарным районам РНК или ДНК вблизи участка-мишени, относится к наиболее перспективным способам искусственной регуляции функционирования РНК. Этот подход, предложенный Н.И. Гриневой под названием «комплементарно-адресованная модификация» еще в 60-е годы прошлого столетия, приобрел особенное значение после открытия важных функций различных РНК, направленное воздействие на которые может иметь значительный терапевтический эффект. Перспективность подхода также связана с его универсальностью, основанной на специфичности комплементарных взаимодействий между цепями нуклеиновых кислот, позволяющей в принципе доставить реакционноспособную группу, модифицирующую или гидролизующую РНК, в любой выбранный участок. К настоящему времени описано множество сиквенс-специфических производных олигонуклеотидов, различающихся строением «адресующей» части и природой присоединенных к ней реакционноспособных групп. К наиболее перспективным из таких групп относятся искусственные рибонуклеазы, состоящие всего из нескольких аминокислотных остатков, которые способны необратимо разрушать целевую РНК (в частности, онкогенные микро-РНК) и которые имеют минимальную токсичность по сравнению с противоопухолевыми агентами, содержащими «небиогенные» химические группы. Однако, известны лишь единичные примеры использования искусственных рибонуклеаз для подавления функций микро-РНК, связанных с развитием патологий. Поэтому создание сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз, способных эффективно подавлять определенные онкогенные микро-РНК в клетках млекопитающих, безусловно, является актуальной задачей.

### **Структура и общая характеристика диссертационной работы.**

Диссертация Чиглинцевой Д.А. хорошо оформлена, написана грамотным языком, имеет традиционную структуру, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Текст изложен на 179 страницах, иллюстрирован 56 рисунками, включает 6 таблиц, список литературы содержит 335 источников.

Раздел «Введение» содержит информацию об актуальности темы исследования, об основной цели и задачах работы, научной новизне, практической и теоретической значимости работы. Кроме того, перечислены основные положения, выносимые на защиту, отражены данные по апробации и личному вкладу соискателя.

Обзор литературы посвящен различным аспектам направленного расщепления РНК по определенным участкам. Подробно описано строение и функции двух ключевых ферментов клетки, имеющих активность такого рода – РНКазы H и РНКазы P1, а также белков семейства Argonaute, которые принимают непосредственное участие в расщеплении определенных последовательностей РНК-мишеней в составе специфических комплексов, образованных с участием малых РНК, комплементарных последовательностям РНК-мишеней. Особенно интересной в этой части является информация о функциях ts-РНК, которые открыты относительно недавно и известны широким кругам молекулярных биологов, по-видимому, меньше, чем функции si-РНК. Автор логически подводит обзор к рассмотрению искусственных рибонуклеаз, и сравнительный анализ данных о работе этих инструментов и эндогенных РНКаз направленного действия позволяет обосновать подход к созданию новых типов сиквенс-специфических РНКаз в настоящей работе. Обзор очень информативен и прекрасно иллюстрирован, что значительно облегчает понимание.

Раздел «Экспериментальная часть» содержит подробное описание материалов и методов, использованных в работе, и впечатляет широтой охвата методов – от подходов классической биоорганической химии для анализа физико-химических параметров взаимодействия искусственных mi-РНКаз с РНК-мишенями до молекулярной биологии и медицинской биохимии для тестирования влияния этих РНКаз на жизнь опухолевых клеток в клеточных культурах и в подопытных животных.

Последующий раздел, посвященный результатам и их обсуждению, представляет собой стройное систематическое исследование, где последовательно описаны все его стадии от постановки задачи и принципов конструирования сиквенс-специфических

[Введите текст]

искусственных РНКаз, направленных на разные участки 4-х выбранных онкогенных микро-РНК-мишеней до тестирования действия этих ми-РНКаз *in vitro* и затем *in vivo*. Этот раздел условно можно подразделить на две большие части – физико-химическую и биологическую. В первой части Чиглинцева Д.А. подробно обосновала принципы, на которых основывался дизайн ми-РНКаз, а затем последовательно описала проверку их способности связываться с целевыми последовательностями РНК-мишеней и характеристики каталитической активности этих РНКаз при различных значениях рН – скорости и эффективности расщепления РНК-мишени и специфической направленности на определенные виды фосфодиэфирных связей. Сравнительный анализ результатов, полученных с различными типами ми-РНКаз позволил автору сформулировать принципы конструирования наиболее эффективных производных данного класса. Очень интересными представляются результаты по совместному расщеплению РНК-мишени ми-РНКазой и РНКазой Н – Д.А. Чиглинцевой был обнаружен синергический эффект, благодаря которому эффективность расщепления возрастает во много раз. Это может существенно повышать результативность применения ми-РНК в клетке за счет рекрутирования эндогенной РНКазы Н.

Во второй, «биологической», части работы Д.А. Чиглинцева описывает столь же систематические исследования активности охарактеризованных в первой части работы ми-РНКаз в линиях опухолевых клеток и на подопытных животных. Предварительно автором показано, что наличие в структуре миРНКаз концевых пептидов и шпилечных структур в дополнение к адресующему домену позволяет достичь устойчивости к нуклеазам, достаточной для осуществления биологического эффекта внутри клетки. Последующее исследование влияния миРНКаз проведено на нескольких линиях опухолевых клеток, рост которых связан с функциями миРНК-21 и миРНК-17, используемых в качестве мишеней в настоящей работе. Д.А. Чиглинцевой удалось показать, что использованные искусственные рибонуклеазы селективно снижают уровни соответствующих мишеней в клетках, что приводит к изменению уровней белков, регулируемых данными ми-РНК. При этом ми-РНКазы оказывали ярко выраженный антипролиферативный эффект, связанный с селективным подавлением экспрессии миРНК-21 и миРНК-17. Наконец, противоопухолевые свойства ми-РНКаз были убедительно продемонстрированы *in vivo* на модельных опухолях у мышей с использованием наиболее современных методов микроскопии.

В целом, работа не только хорошо написана, с минимальным числом опечаток и неудачных выражений, но и очень хорошо проиллюстрирована; все экспериментальные данные по возможности квантифицированы. Все это повышает качество работы и позволяет полноценно оценить полученные результаты.

#### **Достоверность результатов и обоснованность выводов.**

В работе Д.А. Чиглинцевой использованы самые современные методы, и их использование хорошо обосновано. Полученные результаты корректно обработаны и представляются полностью достоверными. На основании результатов, полученных автором в ходе своих исследований, сформулировано 4 развернутых вывода, которые вполне обоснованы и соответствуют результатам выполненной работы.

Данные данного исследования апробированы на Российских и международных конференциях. Результаты диссертационного исследования опубликованы в трёх статьях в рецензируемых журналах, индексируемых базами Web of Science и Scopus, также литературный обзор опубликован в виде обзорной статьи.

#### **Научная новизна и значимость работы.**

Работа Д.А. Чиглинцевой представляет собой первое систематическое исследование воздействия сиквенс-специфических искусственных ми-РНКаз, различающихся строением, а также положением и числом остатков РНК-гидролизующего пептида, на выбранные участки определенных онкогенных ми-РНК. Ценность исследования заключается в том, что в нем исследованы свойства ми-РНКаз с самыми различными вариантами конструкции адресующей части и расположениями каталитического пептида, а также в том, что детально изучены все аспекты воздействия этих инструментов на мишени в постепенно усложняющихся модельных системах – от простых смесей ми-РНКаз с РНК-мишенями в растворе до клеточных линий и, в конечном счете, опухолей у мышей. Полученные результаты позволили сформулировать принципы конструирования наиболее эффективно работающих сиквенс-специфических искусственных РНКаз, подобрать условия для эффективного применения таких конструкций в качестве противоопухолевых агентов и, в целом, продемонстрировать такие РНКазы как перспективные объекты для направленного воздействия на различного рода РНК, непосредственно вовлеченных в патологические процессы.

### **Замечания и предложения.**

По диссертационной работе Д.А. Чиглинцевой есть некоторые замечания.

1. На с. 85, рис. 18А – непонятно, почему полоса миРНК-21 с увеличением концентрации 21-D-ON смещается вверх, хотя этот олигонуклеотид с миРНК не образует дуплекса.

2. На рис. 29Б кривая с 17-BC-β в буфере II идет выше, чем кривая с 17-BC-β в буфере I, хотя на автографе А полосы, соответствующие расщеплению в буфере II, намного слабее, чем в случае буфера А. Как это объяснить?

3. Насколько корректно проведена зеленая кривая на графике фактически по 2м точкам, например, на рис. 24Е? В Материалах и методах не приведен алгоритм проведения кривых по точкам.

4. На с. 145 в абзаце, посвященном противоопухолевому потенциалу миРНКаз, написано: «...что сопоставимо с результатами, полученными для шпилечных миРНКаз в экспериментах на модели лимфосаркомы RLS40 у мышей». Непонятно, чьи это результаты по RLS40.

5. В Заключении на с.146 ссылка на рис. 53 ошибочна – этот рисунок должен иметь номер 56.

6. На рис. 53А, который должен иметь номер 56, описывается блокирование миРНК с целью сохранения активности мРНК – но подобных задач в работе не было поставлено, что имеется в виду?

### **Заключение.**

Диссертационная работа Чиглинцевой Дарьи Александровны «МикроРНК-направленные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты (миРНКазы): каталитические свойства и противоопухолевая активность», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия, представляет собой завершенное научное исследование, в котором решена важная задача по конструированию и проверки функциональной активности сиквенс-специфичных искусственных рибонуклеаз, способных селективно подавлять онкогенные микро-РНК *in vitro* и *in vivo* и имеющих потенциал в качестве эффективных и малотоксичных противоопухолевых агентов.

Несмотря на некоторые замечания, которые носят дискуссионный и рекомендательный характер, диссертационная работа Чиглинцевой Д.А. по актуальности

[Введите текст]

темы, объёму, научной новизне, теоретической и практической значимости отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН для диссертаций, представленных на соискание ученой степени кандидата наук. Диссертационная работа Чиглинцевой Д.А. полностью соответствует требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации, Чиглинцевой Дарья Александровна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - молекулярная биология.

«27» марта 2026 г.

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник. лаборатории структуры и функции рибосом Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,

доктор химических наук

  
\_\_\_\_\_ . Грайфер Дмитрий Маратович

Адрес места работы: 630090, г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, д.8, ИХБФМ СО РАН

Рабочий телефон: 8(383)363-51-40, e-mail: graifer@1bio.ru

Подпись д.х.н. Д. М. Грайфера заверяю

Ученый секретарь ФГБУН ИХБФМ СО РАН,



\_\_\_\_\_ Логашенко Евгения Борисовна

Телефон 8 (383)363-51-55

e-mail: secretary@niboch.nsc.ru