

Отзыв официального оппонента

на диссертацию Чиглинцевой Дарьи Александровне на тему «МикроРНК-направленные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты (микроРНКазы): каталитические свойства и противоопухолевая активность», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 - биохимия

Актуальность темы исследования. Диссертационная работа Дарьи Александровны Чиглинцевой лежит в русле современного направления молекулярной биологии, связанного с изучением свойств некодирующих миРНК, их роли во внутриклеточных процессах и терапевтического потенциала. Считается, что эти молекулы, влияющие на экспрессию свыше 30% всех кодируемых генов (главным образом на посттранскрипторном уровне), участвуют в регуляции метаболического гомеостаза, клеточного цикла, процессов дифференцировки и деления клеток, межклеточных взаимодействиях. Особый интерес к этим молекулам связан с возможностью их использования в качестве терапевтических агентов в патологических процессах различной этиологии. В частности, такая стратегия может успешно применяться при онкогенезе, для которого характерна гиперэкспрессия онкогенных и снижение активности онкосупрессорных миРНК. Эффективным способом в данном случае является таргетирование онкогенной мишени и блокирование ее функций с помощью антисмысловых олигонуклеотидов. В развитие этого подхода было предложено использовать в качестве ингибирующих агентов сиквенс-специфические искусственные рибонуклеазы – микроРНКазы, состоящие из адресующего олигонуклеотида и ковалентно связанной с ним группы, катализирующей расщепление РНК-мишени. Преимуществом таких конструкторов является их способность вызывать многооборотную реакцию разрушения молекул миРНК с необратимым нарушением ее функций. Дальнейшее развитие данного подхода связано с расширением круга микроРНКаз и изучением их противоопухолевого действия на биомоделях, что имеет важное научно-практическое значение. В связи с этим, работа Д.А. Чиглинцевой, посвященная разработке и исследованию биологических свойств оригинальных микроРНК-направленных искусственных рибонуклеаз (микроРНКаз), как эффективных инструментов инактивации онкогенных миРНК, является актуальной и вносит свой вклад в данное научное направление.

Обоснованность и достоверность научных положений, полученных фактов и выводов диссертации. Работа представляет собой многоплановое исследование, результатом которого явилась разработка миРНКаз разных структурных типов, изучение их способности связываться с миРНК-мишенями, определение каталитической активности полученных миРНКаз и влияния их структуры на скорость расщепления мишени. Установлено и экспериментально подтверждено потенцирующее действие РНКазы Н1 в комбинации с миРНКазой на скорость расщепления миРНК-мишеней. В отдельных экспериментах на культурах клеток и на лабораторных животных были исследованы биологическая активность и терапевтический потенциал новых таргетных агентов. Для достижения полученных результатов применялись современные методы молекулярной биологии, том числе радиоизотопное мечение миРНКаз, метод гибридизации олигонуклеотидов и миРНКаз с миРНК, методы количественной ОТ-ПЦР и Вестерн-блот гибридизации, методы гистологической обработки тканей и выделение суммарной РНК из клеток. Комплексный патоморфологический анализ криосрезов опухолевой ткани животных выполнен с использованием современных методов конфокальной микроскопии, иммуногистохимического окрашивания, а также морфометрического анализа. Статистическая обработка данных проведена корректно в соответствии с современными требованиями в области медико-биологических исследований. Полученные результаты соответствуют поставленным цели и задачам, что позволило соискателю сделать обоснованные выводы.

Научная новизна положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. В работе Чиглинцевой Д.А. впервые разработаны миРНКазы четырех структурных типов, воздействующие на различные функциональные области миРНК, выявлены структурно-функциональные особенности, влияющие их активность: наибольшая эффективность обнаружена у конъюгатов с каталитическими пептидами (LRLRG)₂, присоединёнными к концевым фосфатам, и формирующими непрерывные гетеродуплексы с миРНК. Впервые показано, что введение двух каталитических пептидов в структуру миРНКазы многократно увеличивает скорость расщепления миРНК-мишени, а синергизм действия зависит от их пространственного расположения в структуре конъюгата.

Впервые показано, что РНКазы Н1 оказывает синергическое действие на

миРНКазы всех структурных типов и обеспечивает многократное повышение скорости расщепления миРНК по всем функциональным областям. Впервые установлена прямая корреляция между рибонуклеазной активностью миРНКаз, степенью подавления миРНК в опухолевых клетках и противоопухолевым эффектом *in vivo*, что подтверждает перспективность миРНКаз как платформы для создания высокоселективных противоопухолевых препаратов.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

Теоретическая значимость работы состоит в получении новых знаний о характере взаимодействия миРНКаз различных структурных типов с молекулярными мишенями – миРНК, в том числе в живых объектах – культивируемых клетках и животных с опухолевыми трансплантатами. Практическая значимость работы заключается в разработке препаратов нового класса миРНКаз, эффективно подавляющих онкогенные миРНК за счёт их каталитического расщепления и проявляющих высокую противоопухолевую активность. Разработанные подходы могут быть адаптированы для создания эффективных препаратов, направленных на ингибирование других классов РНК, включая рiРНК, tsRNAs, мРНК и длинные некодирующие РНК.

Оценка содержания диссертации и ее завершенности в целом.

Диссертационное исследование Чиглинцевой Д.А. оформлена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы.

Во введении автор обосновывает актуальность темы, степень ее разработанности, указывает цель и задачи, перечисляет основные положения, выносимые на защиту, отмечает новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, описывает методы и методологию исследования, дает сведения об апробации работы.

В обзоре литературы соискатель освещает вопросы, связанные со структурой, особенностью действия РНКаз на примере внутриклеточной РНКазы H1 и ее использованием для направленного ингибирования активности РНК антисмысловыми олигонуклеотидами. Обсуждается и другой тип ингибирования РНК, опосредованный РНКазой Р с использованием внешних направляющих

последовательностей. Рассматриваются вопросы, связанные с использованием белков семейства Argonaute и белков PIWI в процессе ингибирования РНК-мишеней.

В главе «Материал и методы исследования» дана общая характеристика экспериментального материала и представлено описание используемых методов исследования и статистической обработки данных.

В главах собственных исследований изложены основные результаты работы, которые сопровождаются табличным и иллюстративным материалом.

К значимым результатам соискателя относятся впервые разработанные миРНКазы селективно подавляющие онкогенные миРНК. Данный процесс протекает в форме многооборотной реакции и усиливается в присутствии эндогенной РНКазы H1. На основе анализа рибонуклеазной активности разных типов миРНКаз (двойных, петлеобразных, крабоподобных и вилкоподобных) Дарья Александровна установила, что их каталитическая активность зависит от структуры, протяженности адресующих доменов, количества и положения каталитических пептидов, способа их присоединения и ориентации каталитического домена относительно функциональных локусов миРНК, а также нуклеотидной последовательностью миРНК-мишени.

В исследованиях *in vitro* показано, что крабоподобные и вилкоподобные миРНКазы эффективно подавляют онкогенные миРНК, что сопровождается снижением пролиферативной и миграционной активности клеток опухоли.

В экспериментах на животных, при довольно нетрадиционном способе введения крабоподобных миРНКаз (с предварительной трансфекцией перевивочного материала изучаемыми агентами), была установлена прямая зависимость противоопухолевого эффекта от рибонуклеазной активности соединений, что подтвердилось снижением количества митозов и повышением маркера апоптоза в гистологических препаратах опухолевой ткани. Перитуморальное введение мышам с подкожно имплантированными опухолями вилкоподобной миРНК-21-направленной FC (21-FC-βp) миРНКазы в комплексе с липосомами привело к снижению уровня митозов в опухолевых клетках и не оказало токсического влияния на ткани печени и почек. Данные результаты свидетельствуют о терапевтическом потенциале миРНКаз.

Работа Д.А. Чиглинцевой выполнена на достаточном объеме исследуемого материала, оформлена надлежащим образом, содержит 6 таблиц, 56 рисунков, список

цитированной литературы включает 335 источника, общий объем - 179 страниц. Структура диссертации содержит традиционные разделы, в том числе достаточно подробный обзор литературы, обширный раздел материалов и методов, изложение результатов собственной работы и их обсуждение, заключение и выводы. С точки зрения раскрытия темы и реализации поставленных соискателем задач структура и объем диссертации представляются адекватными заявленным целям, выводы соответствуют содержанию. Результаты исследования прошли апробацию на 12 всероссийских и международных научных конференциях, материалы диссертации опубликованы в 4 печатных работах в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и SCOPUS. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Результаты имеют теоретическое значение, связанное с разработкой принципов рационального дизайна миРНК-направленных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов на основе сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз, адресованных к миРНК. Практическая значимость определяется возможностью использования данных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, направленных к онкогенной миРНК, в качестве прототипов лекарственных препаратов.

Принципиальных замечаний по представленной диссертационной работе у меня нет. Тем не менее, считаю, что автор в оформлении выводов допустил слишком много подробностей, которые были бы более уместны в разделе «Заключение». К автору также, имеются вопросы.

1. Почему в эксперименте на мышах с введением крабоподобных миРНКаз проводили их предварительную трансфекцию в перевиваемую культуру опухолевых клеток? Можно ли считать объективными данные по противоопухолевой активности в конце эксперимента?
2. Какова стабильность полученных в работе конъюгатов?

Высказанные замечания имеют уточняющий характер и не умаляют результатов работы.

Заключение. Кандидатская диссертация Чиглинцевой Дарьи Александровны на тему «МикроРНК-направленные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты (микроРНКазы): каталитические свойства и противоопухолевая активность», ,

выполненная под руководством кандидата биологических наук Патутиной Ольги Александровны, является законченной научно-квалификационной работой в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи, имеющей существенное значение для развития биохимии – разработаны и исследованы микроРНК-направленные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты (микроРНКазы) нового дизайна, предназначенные для селективного подавления онкогенных микроРНК. По своей актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте публикации материалов в научных печатных изданиях диссертация полностью соответствует требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автору Дарье Александровне Чиглинцевой следует присудить ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия (биологические науки).

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, доктор биологических наук (03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология)

 Сорокина Ирина Васильевна

Адрес: 630090, г. Новосибирск,
проспект Академика Лаврентьева, дом 9
Тел.: 8 (383) 330-36-63
e-mail: benzol@nioch.nsc.ru

Подпись Сорокиной И.В. заверяю
Ученый секретарь НИОХ СО РАН
кандидат химических наук



Бредихин Р.А.

Дата отзыва: «01» апреля 2026 г.