ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Боженко Владимира Константиновича на диссертационную работу Чернова Петра Владимировича «Оптимизация подходов к дизайну малых интерферирующих РНК для иммунорегуляции онкологической патологии на модели in vitro», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «3.2.7. Иммунология»

Актуальность темы диссертационной работы

Разработка подходов к направленной регуляции экспрессии генов является одной из задач экспериментальной онкологии и иммунотерапии. Для создания таких технологий необходимы молекулы с воспроизводимой активностью, а также методы, позволяющие выбирать их до проведения большого числа клеточных экспериментов. При использовании малых интерферирующих РНК результат определяется последовательностью дуплекса, его химической структурой и условиями поступления в клетку. Поэтому совершенствование дизайна миРНК имеет самостоятельное значение для разработки средств воздействия на опухолевый процесс.

Чернов П. В. исследует возможность дополнить известные правила отбора миРНК анализом распределения условных энергетических характеристик вдоль дуплекса. Работа включает получение соединений и экспериментальную оценку их активности. Такая постановка задачи позволяет сопоставить расчетные критерии с измеряемым эффектом и установить, какие решения заслуживают дальнейшего изучения.

Выбор *CD47* и *ITGB1* обоснован участием соответствующих белков в процессах, важных для опухолевой прогрессии и противоопухолевой защиты. При этом создание миРНК к этим мишеням представляет собой начальный этап разработки технологии. Его результат следует оценивать по качеству полученных олигонуклеотидов и эффективности подавления модельного

транскрипта. В пределах этой задачи тема диссертации актуальна, а выполненное исследование своевременно.

Таким образом, диссертационная работа направлена на совершенствование подходов к дизайну и получению активных малых интерферирующих РНК для дальнейшего изучения иммунологически значимых мишеней опухолевой патологии.

Соответствие темы диссертации указанной специальности

Тема диссертации полностью соответствует паспорту научной специальности «3.2.7. Иммунология» (направления исследований № 3, № 5, № 7).

Основные результаты диссертационной работы

В диссертации Чернова П.В. представлены результаты поэтапного дизайна миРНК, при котором учитываются нуклеотидные свойства последовательности, предполагаемая специфичность, структура участков мРНК и энергетическая сигнатура дуплекса. Автором сформированы исходные наборы из 742 кандидатов к *ITGB1* и 1061 кандидата к *CD47*. После предварительного отбора сохранены 31 и 30 последовательностей соответственно; для каждой мишени проведено сравнение двух серий по шесть дуплексов, различающихся применением дополнительного критерия.

Для оценки полученных соединений автором использована репортерная модель HEK293T, позволяющая сравнивать подавление люциферазного сигнала при одинаковой схеме регистрации. В работе установлены диапазоны подавления 98,2–99,6% для *ITGB1* и 90,3–99,0% для *CD47* при отборе с учетом сигнатуры. В контрольных по алгоритму сериях соответствующие значения составили 74,8–95,3% и 78,8–95,6%. Сопоставление представленных результатов позволяет оценить полезность разработанного признака при первичном выборе соединений.

Далее в диссертационной работе изучены химически модифицированные производные выбранных миРНК I-1 и C1. Автором сопоставлены три схемы размещения 2′-F- и 2′-O-метильных нуклеотидов.

Показано, что изменение схемы модификации позволяет получать варианты с различной остаточной репортерной активностью; для наиболее активных производных она составляла приблизительно 0,001 и 0,003 относительно контроля для *ITGB1* и *CD47*. Результат представляет интерес для последующей оптимизации состава олигонуклеотидов.

Значимый самостоятельный блок исследования посвящен получению и аналитической характеристике соединений. В рамках работы автором проведены твердофазный фосфорамидитный синтез, очистка методом ВЭЖХ и масс-спектрометрическая идентификация MALDI-ToF. Апробировано применение пропионового ангидрида при кэппировании. Это обеспечивает технологическую основу для дальнейшего воспроизводимого получения и изучения отобранных молекул.

Наиболее активные исходные дуплексы I-1 и C1 обеспечивали остаточную относительную активность репортера 0,004 ± 0,001 и 0,0097 ± 0,009 соответственно. После позиционной модификации по Методу 1 для I-1_1 и C1_1 эти показатели составили 0,00098 ± 0,0001 и 0,003 ± 0,0003, что соответствует приблизительно 99,9% и 99,7% подавления в условиях опыта. В МТТ-тесте при концентрациях 2–200 мкг/мл для исследованных модифицированных дуплексов значение CC□□ не было достигнуто. Экспериментальные серии оценивались в пяти биологических повторах.

Сравнение серий с дополнительной фильтрацией и без нее проведено на базе исходных расчетных библиотек 742 и 1061 кандидата, сокращенных после традиционных ограничений до 31 и 30 соответственно; на этапе энергетической сигнатуры для первичной проверки выбрано по шесть дуплексов для каждой мишени. Снижение числа кандидатов на заключительном этапе составило около 81% для *ITGB1* и 80% для *CD47*. При этом превосходство полученных серий следует оценивать по экспериментально представленным диапазонам подавления, а не как доказанную универсальную статистическую закономерность.

Таким образом, обоснована эффективность предложенного комплекса расчетных, синтетических и экспериментальных решений для отбора и первичной проверки кандидатных миРНК, а также для направленной настройки их активности посредством позиционной химической модификации в модели *in vitro*.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Цели и задачи четко сформулированы. Применённые биоинформатические методы, твердофазный синтез и контроль качества олигонуклеотидов, а также клеточные методы оценки интерферирующей активности соответствуют поставленным задачам. Экспериментальные исследования проведены с использованием контрольных групп и биологических повторов. Полученные данные обработаны с применением адекватных статистических методов и достоверны.

Научная новизна диссертационной работы

Новым элементом исследования является использование энергетической сигнатуры как дополнительного признака при выборе миРНК и проектировании их модифицированных производных. В отличие от оценки только интегральных характеристик последовательности, предложенная процедура учитывает расположение отдельных участков вдоль дуплекса. Ее применение проверено экспериментально на двух генах-мишенях.

Впервые в работе предложена и на экспериментально синтезированных миРНК проверена связанная технологическая схема, при которой параметры энергетической сигнатуры учитываются сначала при выборе последовательностей, а затем при позиционном распределении 2′-F- и 2′-O-метильных модификаций. В отличие от традиционной оптимизации по нуклеотидному составу и терминальной стабильности, автором введены критерии локальных градиентов, плато и особенности области между 10-м и 11-м нуклеотидами антисмысловой цепи.

Автор получил активные олигонуклеотиды и показал различную направленность изменения репортерного эффекта при использовании трех схем модификации. Это представляет интерес для разработки правил позиционного размещения химически измененных мономеров. Новизна относится к исследованному сочетанию критериев и его экспериментальной проверке; установление общего механизма влияния сигнатуры на работу комплекса РНК-интерференции остается задачей дальнейших исследований.

Еще одним впервые полученным результатом является экспериментальное разграничение трех вариантов химического дизайна по функциональному эффекту: усиление нокдауна, сохранение исходной интерферирующей активности и получение частичного специфического подавления – на одном и том же нуклеотидном каркасе молекул I-1 и C1. Оригинальность определяется прежде всего совокупностью схем, их целенаправленным расчетным обоснованием и проверкой, а не самим фактом использования известных 2′-F- и 2′-O-метильных мономеров.

Полученные результаты формируют научную основу для дальнейшей разработки рациональных способов позиционной химической модификации малых интерферирующих РНК.

Теоретическая значимость диссертационной работы

В диссертационной работе показана связь между расположением химически модифицированных звеньев и изменением активности исследованных дуплексов. Это расширяет представления о возможностях управления эффектом РНК-интерференции на стадии проектирования соединений. Предложенная энергетическая сигнатура обеспечивает способ систематизации признаков, которые в дальнейшем могут быть сопоставлены с результатами испытаний других последовательностей.

Особую ценность представляют полученные экспериментальные данные о влиянии выбранных вариантов химической структуры на функцию миРНК. На их основе может быть организована дальнейшая проверка устойчивости олигонуклеотидов, подавления эндогенных транскриптов и эффективности

доставки. Исследование формирует основу для таких работ, не подменяя собой их результаты.

Результаты вносят вклад в развитие представлений о комплексном характере биологического действия синтетических миРНК, при котором выраженность интерферирующего эффекта и влияние на жизнеспособность клеток рассматриваются как самостоятельные характеристики, требующие раздельной оценки.

Научно-практическая значимость диссертационной работы

В практическом плане выполненное исследование дает воспроизводимую последовательность операций для получения активных кандидатных миРНК – от вычислительного выбора целевого участка до выделения и аналитической характеристики готового соединения. Приложенные автором последовательности и программные материалы могут использоваться для планирования новых серий химического синтеза и первичной проверки активности.

Разработанные решения можно рассматривать как технологическую платформу для воспроизводимого получения серий миРНК к новым генам-мишеням: программное ранжирование сопровождается стандартизированным фосфорамидитным синтезом, ВЭЖХ-очисткой, MALDI-ToF-идентификацией и быстрым количественным репортерным скринингом. Возможность использования 2′-F- и 2′-O-метильных мономеров без принципиальной перестройки стандартного синтетического цикла и апробация кэппирования пропионовым ангидридом дополнительно облегчают масштабирование лабораторной процедуры. Эти достоинства описаны автором в методической и дискуссионной частях работы.

С точки зрения организации раннего предклинического этапа ключевым ресурсосберегающим результатом является возможность до синтеза сократить набор кандидатов на 80–81% относительно небольших библиотек, прошедших исходный фильтр, и затем сосредоточить углубленный анализ на наиболее активных сериях. Такая схема перспективно уменьшает загрузку синтезатора,

количество хроматографических очисток, расход реагентов, объем клеточных тестов и трудозатраты сотрудников, а при расширении числа мишеней потенциально сокращает общую продолжительность предклинического скрининга. Однако прямых измерений экономии средств, человеко-часов и длительности цикла разработки в диссертации нет, поэтому данные преимущества корректно оценивать как прогнозируемый эффект масштабирования подхода.

С позиций экспериментальной онкологии наиболее значимо получение молекул к *CD47* и *ITGB1*, которые потенциально позволяют избирательно исследовать разные звенья опухолевой прогрессии. Проверка действия на эндогенные белки, на опухолевые клетки и на взаимодействие с макрофагами относится к следующему этапу; тем самым практическая ценность диссертации состоит прежде всего в создании исходной молекулярной платформы.

При развитии этой платформы важным будет сопоставление схем модификации с параметрами внутриклеточного накопления, продолжительностью эффекта и доступностью целевых транскриптов. Полученные автором данные о репортерной активности и технологические решения для синтеза служат исходной основой для дальнейшего изучения этих характеристик в доклинических моделях.

Направления дальнейшего технологического развития включают внедрение фосфоротиоатных и LNA-модификаций, сопоставление устойчивости и специфичности серий, проверку нецелевых эффектов, совместимость с GalNAc- и другими системами доставки и перенос в клеточные и животные модели опухоли. В диссертации также обсуждены опубликованные результаты по *PCSK9* как возможное подтверждение применимости энергетической сигнатуры за пределами двух исходных мишеней, однако распространение выводов на новые классы олигонуклеотидов требует самостоятельной валидации.

Таким образом, научно-практическая значимость диссертационной работы заключается в создании экспериментально обоснованных предпосылок для совершенствования критериев оценки перспективности синтетических миРНК. Полученные результаты позволяют более четко разграничивать характеристики соединений, подтвержденные в клеточных моделях, и свойства, требующие дополнительной проверки, что имеет существенное значение для повышения обоснованности последующих исследований в области молекулярной онкоиммунологии.

Общая характеристика диссертационной работы

Работа построена по принятой для экспериментальных исследований схеме и содержит введение, четыре главы, заключение, выводы, список литературы, справочные материалы и пять приложений. Основная часть вместе со списком литературы занимает 151 страницу; представленный документ с приложениями содержит 287 страниц. В диссертации приведены 23 рисунка и 15 таблиц, использованы 122 литературных источника, из которых 9 отечественных и 113 зарубежных.

Обзор литературы характеризует предпосылки использования РНК-интерференции в онкоиммунологии и существующие подходы к дизайну олигонуклеотидов. Далее изложены методы и результаты отбора, синтеза, химической модификации и тестирования. В работе использованы основные современные методы иммунологии и молекулярной биологии. Обсуждение связывает полученные данные с возможностями последующей разработки иммунорегуляторных средств. Последовательность изложения позволяет оценить соответствие выполненных этапов цели исследования.

Выводы обоснованы и четко сформулированы. Заключение включает обсуждение основных итогов и перспектив дальнейшего развития исследуемого подхода.

Диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне и представляет собой объемное, целостное научное исследование.

Материалы диссертации доложены на российских и международных научных мероприятиях. Основные результаты диссертационного исследования опубликованы в четырех статьях в рецензируемых научных изданиях.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Замечания.

Автор диссертации прекрасно понимает ограничения проведенного исследования, о чем он косвенно говорит в автореферате в разделе «Перспективы дальнейшей разработки темы» (на стр.21 автореферата). В тоже время, хотелось подчеркнуть, что исследования проведены только на модельной репортерной системе и не включают исследований по подавлению экспрессии генов, работающих в, например, клетках карциномы печени с доказательством подавления экспрессии методом РВ-ПЦР. Этих данные существенно украсили бы работу. Также хотелось бы привести данные по использованию полученной методологии расчета перспективных последовательностей siRNA для других актуальных генов, например генов, для которых уже получены и опубликованы такие эффективные последовательности, будут ли они воспроизводится разработанным методом. В целом, сделанные замечания являются скорее рекомендациями для возможного продолжения работы и не умаляют качество и достаточность проведенных исследований.

Заключение

Диссертационная работа Чернова Петра Владимировича «Оптимизация подходов к дизайну малых интерферирующих РНК для иммунорегуляции онкологической патологии на модели in vitro» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «3.2.7. Иммунология» (медицинские науки) является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных задач, имеющих существенное значение для иммунологии: автором разработан и экспериментально апробирован способ

получены и охарактеризованы олигонуклеотиды к иммунологически значимым мишеням *CD47* и *ITGB1*; показано влияние позиционно-специфических химических модификаций на выраженность интерферирующего эффекта в клеточной репортерной модели.

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 в актуальной редакции), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «3.2.7. Иммунология» (медицинские науки).

Официальный оппонент

Доктор медицинских наук, профессор,
заведующий научно-исследовательским
отделом молекулярной биологии
и экспериментальной терапии опухолей
Федерального государственного
бюджетного учреждения «Российский
научный центр рентгенорадиологии»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации

(подпись)

Боженко
Владимир Константинович
«06» 11 2026 г.

Подпись д.м.н., профессора В. К. Боженко заверяю:

Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

д.м.н., проф., Цаллагова З.С.

Подпись _____ «06» 11 2026 г.
М. П.

Контактная информация: ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России.
Адрес: 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 86.
E-mail: vbojenko@rncrr.ru. Сайт: https://www.rncrr.ru/