ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора
Фатхудинова Тимура Хайсамудиновича
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 (медицинские науки)

Актуальность темы диссертационной работы

Развитие злокачественной опухоли зависит не только от свойств самих опухолевых клеток, но и от их взаимодействия с иммунной системой и окружающими тканями. Поэтому изучение молекул, участвующих в этих взаимодействиях, и разработка способов направленного изменения их активности имеют важное значение для современной экспериментальной иммунологии.

Выбор генов CD47 и ITGB1 в качестве мишеней представляется обоснованным. CD47 участвует в защите клеток от поглощения макрофагами, а ITGB1 кодирует β1-субъединицу интегринов, обеспечивающих взаимодействие клетки с внеклеточным матриксом. Возможность уменьшать экспрессию этих генов представляет интерес для исследования механизмов опухолевого роста и иммунного уклонения. При этом значение соответствующих белков для нормальных клеток определяет важность не только силы, но и избирательности воздействия.

В диссертации решается необходимая для таких исследований методическая задача: разработка подходов к отбору активных малых интерферирующих РНК (миРНК) и выбору химических модификаций, изменяющих их действие. Сочетание расчетного проектирования с экспериментальной проверкой позволяет сделать поиск кандидатных молекул более обоснованным. Таким образом, актуальность темы диссертационной работы не вызывает сомнений.

Соответствие темы диссертации указанной специальности

По своему содержанию и направленности работа соответствует паспорту научной специальности 3.2.7. Иммунология, в том числе направлениям исследований № 3, № 5 и № 7. Иммунологическая значимость исследования определяется выбором мишеней и созданием молекулярных инструментов для последующего изучения противоопухолевого иммунного ответа.

Основные результаты диссертационной работы

Исследование построено последовательно: от вычислительного отбора миРНК к их синтезу, проверке активности в клеточной модели и направленной химической модификации. Автором сформированы библиотеки последовательностей к CD47 и ITGB1, проведено их ранжирование с учетом нуклеотидных и структурных признаков, предполагаемой специфичности и доступности целевых участков мРНК. В качестве дополнительного критерия отбора предложен метод энергетической сигнатуры.

Для каждого гена сопоставлены серии дуплексов, отобранных с использованием энергетической сигнатуры и без этого критерия. Функциональную активность оценивали в клетках HEK293T с помощью люциферазных репортерных конструкций, содержащих целевые последовательности. На представленных экспериментальных сериях показана перспективность дополнительного критерия ранжирования: отобранные с его учетом молекулы обеспечивали более выраженное подавление репортерного сигнала.

Для наиболее активных исходных дуплексов I-1 и C1 разработаны три схемы позиционно-специфической химической модификации с использованием 2′-F- и 2′-O-метильных производных рибозы. Одна из схем усиливала интерферирующее действие, другая сохраняла его на уровне исходной молекулы, третья уменьшала. Полученные данные показывают возможность изменения активности исследованных миРНК без замены их нуклеотидной последовательности.

Автором выполнены синтез, хроматографическая очистка и физико-химическая идентификация олигонуклеотидов. В дополнение к оценке интерферирующей активности проведен МТТ-тест: в исследованных условиях выраженного цитотоксического действия модифицированных дуплексов не выявлено. В целом работа объединяет взаимосвязанные вычислительный, химический и клеточно-биологический этапы.

Достоверность полученных результатов

Обоснованность результатов обеспечивается последовательным планом исследования, использованием современных методов синтеза и анализа олигонуклеотидов, биологическими повторами, наличием контрольных образцов и статистической обработкой данных. В репортерных опытах использованы отрицательный контроль siGFP и положительный контроль siLuc. Это позволяет оценивать действие исследуемых молекул в сопоставимых экспериментальных условиях.

Выбор клеток HEK293T и люциферазной системы соответствует задаче первичного сравнительного исследования миРНК. Представленные результаты дают основания для выводов об активности выбранных дуплексов в данной модели и о ее изменении при химической модификации. При оценке дальнейших перспектив важно сохранять различие между результатами этого этапа и проверкой действия молекул на собственные РНК и белки опухолевых клеток.

Научная новизна диссертационной работы

Научная новизна связана с разработкой и экспериментальной апробацией конкретного подхода к отбору и модификации миРНК на основе энергетической сигнатуры. Предложенное описание учитывает расположение участков с различными условными энергетическими характеристиками вдоль дуплекса и используется при выборе кандидатных последовательностей и позиций химических модификаций.

Оригинальная часть исследования заключается в предложенных правилах описания энергетической сигнатуры и их практического

использования в единой процедуре проектирования. Подход развивает известные представления о значении термодинамической асимметрии РНК. Применение предложенных правил проверено на молекулах к двум иммунологически значимым мишеням, CD47 и ITGB1.

Самостоятельный интерес представляют результаты сравнительного исследования трех схем модификации. Они показывают, что химические изменения могут использоваться не только для усиления, но и для уменьшения активности конкретных дуплексов. Это расширяет возможности рационального подбора молекулярных инструментов для экспериментальной работы.

Теоретическая значимость диссертационной работы

Теоретическое значение исследования состоит в уточнении связи между строением миРНК, расположением химических модификаций и измеряемой интерферирующей активностью. Метод энергетической сигнатуры представляет собой упрощенную модель, позволяющую формулировать проверяемые предположения и сопоставлять их с результатами клеточных экспериментов.

Работа создает основу для дальнейшего изучения того, какие признаки дуплекса определяют его функциональные свойства. Возможность получать варианты миРНК с различной активностью также представляет интерес для исследования зависимости клеточных функций от степени подавления выбранного гена.

Научно-практическая значимость диссертационной работы

Практическая значимость заключается в разработке последовательного подхода к переходу от расчетных библиотек к ограниченному набору экспериментально охарактеризованных молекул. Полученные миРНК и предложенные схемы их модификации могут использоваться как исходные инструменты для дальнейших исследований молекулярных механизмов опухолево-иммунных взаимодействий.

Для CD47 следующим содержательным этапом является оценка количества белка на поверхности клеток и их взаимодействия с макрофагами; для ITGB1 представляет интерес проверка изменений клеточной адгезии и взаимодействия с микроокружением. Перспективы такого применения не следует отождествлять с уже доказанной лечебной эффективностью. Ценность выполненного исследования состоит в создании методической и экспериментальной основы для перехода к этим задачам.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация включает введение, четыре главы, заключение, выводы, справочные разделы, список литературы и пять приложений. Текст до начала приложений занимает 151 страницу. Работа иллюстрирована 23 рисунками и 15 таблицами; библиографический список содержит 122 источника.

Литературный обзор раскрывает предпосылки исследования и обосновывает выбор молекулярных мишеней. В методической части описаны основные этапы вычислительного и экспериментального исследования. Изложение результатов и их обсуждение позволяют проследить переход от исходной идеи к проверке активности полученных соединений. Работа обладает внутренним единством, а ее основные разделы связаны с поставленными задачами.

Личный вклад соискателя прослеживается в разработке алгоритмов и программных сценариев, планировании исследования, выборе схем химической модификации, анализе и интерпретации результатов. Основные материалы представлены в четырех статьях в рецензируемых научных изданиях и обсуждены на профильных российских и международных научных мероприятиях. Автореферат отражает основное содержание диссертации, ее результаты и выводы.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

При общей положительной оценке работы представляется целесообразным обсудить следующие замечания и вопросы.

Замечания

1. Репортерная модель обоснована для первичного отбора и сравнения миРНК. Вместе с тем отдельные формулировки об иммунорегуляторном действии являются слишком обобщенными, необходимо яснее разграничить установленную репортерную активность и предполагаемые изменения опухолево-иммунных взаимодействий.
2. Данные подтверждают возможность изменения активности исследованных дуплексов. Для характеристики этого результата как «прецизионного управления» было бы полезно уточнить, в какой мере уже возможно заранее задавать степень подавления, а также яснее разграничить условное описание энергетической сигнатуры и ее физическую интерпретацию.

Вопросы

1. Какие результаты наиболее убедительно показывают дополнительную ценность «энергетической сигнатуры» по сравнению с известными критериями отбора миРНК? В чем собственно непосредственная новизна предложенного подхода?
2. Рассматривалось ли использование нецелевых миРНК, например siGFP или scramble-вариантов, с теми же химическими модификациями для дополнительной оценки неспецифического влияния модификаций?
3. Как при дальнейшем развитии работы Вы предлагаете выбирать достаточную степень подавления CD47 в опухолевых клетках с учетом необходимости сохранять его функции в нормальных клетках?

Замечания и вопросы имеют уточняющий и дискуссионный характер и не снижают общей положительной оценки работы.

Заключение

Диссертационная работа «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: разработан комплексный подход к вычислительному отбору малых интерферирующих РНК, включающий метод энергетической сигнатуры; получены экспериментальные данные об активности миРНК к генам CD47 и ITGB1 в репортерной системе; показана возможность изменения выраженности интерференции путем позиционно-специфической химической модификации выбранных дуплексов.

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

Официальный оппонент

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

_____
(подпись)
Фатхудинов
Тимур Хайсамудинович
«02» 11 2026 г.

Подпись д.м.н., профессора Т. Х. Фатхудинова заверяю:

Ученый секретарь, к.фарм.н., доцент Т.В. Максимова

Подпись _____ «02» 11 2026 г.

М. П.

Контактная информация: ФГАОУ ВО РУДН.
Адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.
E-mail: fatkhudinov-tkh@rudn.ru. Сайт: https://www.rudn.ru/