

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента на диссертационную работу

### **БИШАНИ АЛИ**

на тему «Влияние химических модификаций и липидных средств доставки на биологическую активность иммуностимулирующей РНК *in vitro* и *in vivo*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

1.5.3. – Молекулярная биология

#### **Актуальность избранной темы**

Биологически активные вещества на основе нуклеиновых кислот уже достаточно давно используются для создания лекарственных средств. Терапевтические нуклеиновые кислоты применяют для коррекции генетических заболеваний, регуляции процессов в организме на уровне клетки и для воздействия на иммунную систему. Иммуотропные свойства были описаны как для молекул ДНК, так и для молекул РНК. Направленная регуляция иммунной системы с помощью биологически активных соединений выглядит заманчивой перспективой, поскольку позволяет надеяться на эффективное решение проблем иммунорезистентных состояний не только при инфекционных, но и при онкологических заболеваниях. Иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты (НК) способствуют активации противоопухолевого ответа в организме и могут быть использованы как компоненты комбинированной терапии. При этом, эффективность стимуляции иммунной системы существенно зависит от того, насколько эффективно НК могут проникать в клетки, могут ли они доставляться специфически только в целевые клетки-мишени и как долго НК могут находиться в стабильной форме в кровотоке. Указанные проблемы могут быть решены путем применения оптимальной системы доставки НК. Именно поэтому, систематическое изучение влияния средств доставки иммуностимулирующих НК на их биологические активности на уровне клетки и на уровне организма является актуальной задачей, которой посвящена диссертация Бишани Али.

#### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Диссертация Бишани Али построена по стандартной схеме, и содержит все необходимые разделы: введение с обоснованием актуальности исследования и постановкой цели и задач, обзор литературы, экспериментальную часть с методами исследования, описание результатов исследования и их обсуждение, выводы, заключение и список цитированной литературы. Работа изложена на 134 страницах, содержит 24 рисунка, 10 таблиц; список цитируемой литературы включает 421 источник.

В своей работе в качестве основной цели исследования Бишани Али указывает изучение влияния химических модификаций и липидных средств доставки на биологическую активность иммуностимулирующей РНК *in vitro* и *in vivo*. Для достижения поставленной цели им были сформулированы 5 задач, которые были успешно решены, что отражено в выводах. Четыре положения, выносимые на защиту, сформулированы в соответствии с полученными результатами исследования.

Обзор литературы посвящен терапевтическим нуклеиновым кислотам. Подробно рассмотрены способы распознавания экзогенных нуклеиновых кислот в организмах высших эукариот, активация сигнальных путей и связанная с этим иммуностимулирующая активность НК, зависимость активности от состава, размера и нуклеотидной последовательности НК. Второй раздел посвящен современным представлениям о том, при каких состояниях и в каких формах могут быть использованы иммуностимулирующие НК. Очень важно также, что в обзоре литературы описаны достоинства и недостатки существующих систем доставки терапевтических НК в клетки.

В качестве иммуностимулирующей РНК в работе Бишани Али использовал короткую дцРНК (19 п.н.) с 3'-три-нуклеотидными выступами (исРНК), которая ранее демонстрировала подавление пролиферации опухолевых клеток и иммуностимулирующую активность через активацию продукции цитокинов (интерферонов I типа). Хочется отметить, что исследование построено логически: на первом этапе работы продемонстрированы противовоспалительные эффекты и отсутствие признаков острой токсичности при применении указанной исРНК в комплексе с катионными липосомами на животных с индуцированным фиброзом легких. Далее, проведено более детальное изучение влияния строения новой липидной системы доставки исРНК на интерферон-индуцирующее и антипролиферативное действие липидных комплексов исРНК в экспериментах на культурах клеток и на животных. И, на финальной стадии исследования, изучено влияние специфических химических модификаций (2'-фтор-, 2'-О-метил, фосфотиоат, холестерин, концевой амин) в структуре самой молекулы исРНК на интерферон-стимулирующую и антипролиферативную активность с применением системы доставки, отобранной и изученной на предыдущем этапе исследования. Положения, выносимые на защиту, полностью подкреплены полученными результатами.

Работа Бишани Али выполнена с применением современных экспериментальных методов, таких как культивирование клеток человека и мыши, формирование активных липоплексов с исРНК, мультиплексный иммуноферментный анализ, проточная цитофлуориметрия, количественный ОТ-ПЦР, создание опухолевых моделей и моделей фиброза легких на мышах, приготовление и анализ гистологического материала тканей

мышцы, статистический анализ полученных первичных данных. Все указанные методы позволили выполнить работу на высоком экспериментальном уровне.

Диссертационная работа Бишани Али производит хорошее впечатление. Выводы, сформулированные в работе, базируются на обширном экспериментальном материале. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации.

### **Достоверность, новизна и значимость полученных результатов**

Диссертационная работа Бишани Али является логическим продолжением исследования, обнаружившего иммуностимулирующие свойства у короткой дцРНК. Таким образом, новизна полученных результатов обусловлена как уникальностью указанной дцРНК, так и новыми вариантами липидной системы доставки на основе 2X3-DOPE.

В работе впервые изучено влияние системы доставки на биологическую активность исРНК и показано, что состав катионных липосом принципиально важен для интерферогенного, антипролиферативного и противоопухолевого действия исРНК. Впервые изучены исРНК, содержащие химические модификации рибозы, фосфата, а также 3' и 5' концов НК. Впервые показано, что модификации по-разному влияют на интерферон индуцирующую и антипролиферативную функции исРНК. В работе выполнены необходимые экспериментальные и технические повторы, обработка результатов проведена с применением статистической обработки данных методом двухфакторного дисперсионного анализа с множественным тестом сравнения Dunnett. В *in vivo* экспериментах статистический анализ проведен с использованием непараметрического теста Манна-Уитни для непарных выборок.

По материалам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в высокорейтинговых рецензируемых журналах (3 из которых исследовательские статьи и 1 обзор литературы), индексируемых в базах данных Web of Sciences и Scopus.

Результаты, представленные в диссертационной работе, являются новыми и имеют большой потенциал для молекулярной биологии, иммуноонкологии и клеточной биологии. Данные, полученные Бишани Али с соавторами о влиянии структуры и состава липоконъюгатов в составе липосом на интерферон-стимулирующую и антипролиферативную активность доставляемой ими исРНК могут быть использованы для создания эффективных систем доставки для других терапевтических РНК, что указывает на высокую практическую значимость работы.

## **Замечания**

В результате прочтения работы возникли небольшие замечания, которые имеют дискуссионный или технический характер:

1. При исследовании влияния исРНК на развитие фиброза легких у мышей, индуцированного BLM и LPS, в работе проводили анализ уровня IL6 и TNF- $\alpha$  в бронхоальвеолярной жидкости у животных в конце эксперимента, и было показано, что не было обнаружено достоверных различий в уровнях этих цитокинов между группами. Хотелось бы более подробно узнать мнение автора, почему только именно этих два цитокина были проанализированы.
2. Автор пишет, что отсутствие изменений в уровне экспрессии Pkt мРНК в клетках RLS40, обработанных исРНК/2X3-DOPE или 2X3-DOPE, по сравнению с клетками меланомы B16, где наблюдали 7-кратное увеличение уровней экспрессии Pkt мРНК можно объяснить тем, что RLS40 относятся к "нереагирующим" клеточным линиям скорее из-за особенностей их тканевого происхождения. Влияет ли на обнаруженные различия тот факт, что меланомы являются одними из наиболее 'иммуногенных' опухолей? Есть ли данные по стимуляции экспрессии Pkt мРНК в клетках RLS40 другими иммуностимулирующими нуклеиновыми кислотами?
3. Антипролиферативную активность комплексов исРНК/липосомы *in vitro* оценивали WST-1 тестом. В разделе "Материалы и методы" описание WST-1 теста отсутствует. Кроме того, автор пишет, что анализ проводили через 2-7 дней после трансфекции (С. 73), а на Рис. 14 (Рис. 6 в автореферате) представлены данные для 1-5 дней после трансфекции исРНК в клетки.

Сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не умаляют научной ценности полученных данных и сделанных выводов, и не снижают общего очень хорошего впечатления от диссертационной работы.

## **Заключение**

Диссертационная работа Бишани Али на тему: «Влияние химических модификаций и липидных средств доставки на биологическую активность иммуностимулирующей РНК *in vitro* и *in vivo*» является законченной научно-квалификационной работой, имеющей большое научно-практическое значение для молекулярной биологии и иммуноонкологии. По своей актуальности, новизне, уровню проведенных исследований и практической значимости диссертация полностью соответствует требованиям пп. 2.1 – 2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,

предъявляемых к кандидатским диссертациям. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Таким образом, соискатель Бишани Али заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.3. — Молекулярная биология.

Ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии ФГБУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ФГБУН ИХБФМ СО РАН), доктор биологических наук (03.01.03 -Молекулярная биология)



Коваль Ольга Александровна

630090, г. Новосибирск,  
пр. Ак. Лаврентьева, 8  
телефон: 8 (383) 363-51-90  
e-mail: o.koval@niboch.nsc.ru

подпись д.б.н. Коваль О.А. заверяю  
Учёный секретарь ФГБУН ИХБФМ СО РАН  
телефон: 8 (383) 363-51-55  
e-mail: secretary@niboch.nsc.ru



Логашенко Е.Б.

дата отзыва: 10 сентября 2024 г.