

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу

Али Бишани

«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 темы исследования. Разработка лекарственных препаратов на основе терапевтических нуклеиновых кислот (ТНК) является важной задачей, поскольку накоплены сведения об их способности корректировать развитие патологических процессов, в том числе, путем активации иммунной системы. ТНК взаимодействуют с клеточными паттерн-распознающими рецепторами (PRR), что приводит к индукции апоптоза, подавлению пролиферации клеток, стимуляции секреции интерферонов и других цитокинов. Доставка ТНК к целевым клеткам остаётся ключевой проблемой, решение которой идет по двум направлениям: улучшение транспортных систем и защита ТНК от деградации путем химической модификации. Эти подходы могут привести к созданию эффективных препаратов на основе ТНК, не имеющих нежелательного побочного действия. Однако для иммуностимулирующих ТНК эти факторы остаются недостаточно изученными, что является критическим пробелом в данной области. В связи с этим очень актуальной является работа Бишани Али, направленная на исследование химических модификаций и липидных средств доставки уникальной иммуностимулирующей РНК (исРНК), для которой ранее было выявлено значительное антипролиферативное и противоопухолевое действие.

Научная новизна диссертационной работы Бишани Али не вызывает сомнения. Впервые показано, что профилактическое введение исРНК в комплексе с липосомами может предотвращать развитие легочного воспаления и фиброза, опасного патологического процесса, который развивается под действием бактериальной инфекции в модели индукции липополисахаридом (ЛПС). Установлено, что состав катионных липосом, использованных для доставки иммуностимулирующей РНК, влияет на ее противоопухолевое действие, а также способность усиливать секрецию интерферона альфа (ИФН-α). Впервые показано, что химические модификации рибозы, фосфата, а также 3' и 5' концов оказывают различное влияние на способность исРНК индуцировать секрецию ИФН-α и подавлять пролиферацию опухолевых клеток.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты диссертационной работы Бишани Али позволяют расширить представления о молекулярных механизмах иммуностимулирующего действия экзогенных РНК. Выявленное

свойство исРНК подавлять рост опухоли независимо от способности индуцировать ИФН- α важно для разработки высокоспецифичных противоопухолевых препаратов. Полученные результаты, говорящие о влиянии состава катионных липосом позволят создавать новые комплексы для направленной доставки, которые помогут усиливать либо отменять определенные биологические эффекты препаратов на основе РНК. Проведенный в работе комплексный анализ влияния химических модификаций в составе исРНК может быть использован также для разработки других терапевтических препаратов на основе siРНК, мРНК вакцин, действующих с высокой эффективностью и без нежелательных побочных эффектов.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа Бишани Али изложена на 135 страницах машинописного текста и содержит 24 рисунка и 10 таблиц. Диссертация включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список цитируемой литературы, состоящий из 421 источников.

Во введении автор обоснованно представляет актуальность выбранного исследования, четко формулирует цель и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы посвящен современному состоянию проблемы, изучаемой в настоящей работе, а именно: влиянию систем доставки и химических модификаций на биологические функции иммуностимулирующей РНК. Часть обзора, посвященная терапевтическим нуклеиновым кислотам, определяет важность этого подхода для лечения различных заболеваний, подробно рассматривает механизмы влияния на иммунную систему, специфику связывания лигандов с рецепторами, приводящую к активации различных сигнальных путей, а также применение иммуностимулирующих нуклеиновых кислот, таких как адъюванты для вакцин и препараты для лечения опухолей. В обзоре приведено описание различных способов доставки, а также преимущества и побочные эффекты каждой из них. Отдельная глава предоставляет информацию об используемых химических модификациях и их влиянии на биологические функции нуклеиновых кислот. В целом, обзор представляет необходимые и современные данные по изучаемой проблеме. В заключении автор определяет перспективы влияния систем доставки и химических модификаций на функции иммуностимулирующей РНК и безопасность ее использования.

Материалы и методы исследования являются современными и полностью адекватны поставленной цели и решаемым задачам. В работе использовали методы иммуноферментного анализа, профилирования цитокинов с помощью цитофлуорометрии, методы работы с клеточными культурами и лабораторными животными, такие как биохимические методы оценки клеточной пролиферации, гистологический анализ и морфометрирование.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из трех частей, в которых последовательно представлены эксперименты по влиянию исРНК на развитие

легочного фиброза, индуцированного на различных моделях *in vivo*, а также влияние систем доставки и химических модификаций на биологические функции исРНК. Убедительно показано, что использование исРНК в профилактической схеме перед индукцией фиброза легких под действием бактериального ЛПС может способствовать уменьшению фиброзных изменений, а использование ее в схеме терапии после индукции патологического процесса не влияет на развитие фиброза. Установлено, что компоненты липидных комплексов, основанных на 2X3-DOPE, оказывают различное влияние на эффективность интерферон-индуцирующего и антипролиферативного действия исРНК. Увеличение длины ПЭГ в липоконъюгатах, входящих в состав липосом, значительно увеличивает эффективность индукции ИФН- α в соответствии с концентрацией исследуемой РНК. Базовая система доставки 2X3-DOPE, без дополнительных липоконъюгатов, наиболее эффективно усиливает антипролиферативное действие РНК на клетки меланомы B16 и противоопухолевое действие на клетки этой опухоли в мышинной модели. Это положительно коррелирует с эффективностью накопления РНК в клетках и ее способностью активировать экспрессию маркера Pkr, не зависящую от активации продукции интерферона и других цитокинов. Значительный интерес представляют результаты, показавшие, что химические модификации, такие как 2'-фтор-, 2'-О-метил, фосфотиоат, холестерин и концевой амин в составе исРНК, в зависимости от типа модификации, местоположения в цепи и выбранной цепи, по-разному влияют на интерферон-индуцирующее и антипролиферативное действие исРНК. Определены соединения, показавшие улучшенные интерферон-индуцирующие (F2/F2 и F2_S/F2) и антипролиферативные (F2_S5/F2_S5, F2-NH2/F2-NH2 и Ch-F2/Ch-F2) свойства.

В разделе «Заключение» Бишани Али делает обоснованный вывод о том, что исследованные производные исРНК в комплексе с катионными липосомами представляют собой прототипы лекарственных препаратов для клинических исследований, поскольку обладают различной интерферон - индуцирующей, противоопухолевой, антипролиферативной активностью. Выводы сформулированы в соответствующем разделе, являются обоснованными и полностью соответствуют поставленным целям и задачам.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на 5-ти всероссийских и международных конференциях. По результатам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации и дает представление об основных разделах работы и полученных результатах.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе Бишани Али не возникло. В качестве одного из недостатков в оформлении автореферата следует указать трудноразличимые подписи на большинстве рисунков, возникшие при уменьшении их размера. Незначительное количество опечаток, неудачных выражений не мешает общему восприятию при прочтении работы. Однако, возникли дискуссионные вопросы, которые рекомендуется обсудить:

1) В настоящее время в практической медицине при лечении ряда заболеваний уже применяются как интерферон – индуцирующие препараты, так и непосредственно интерфероны. Каковы наиболее значимые преимущества разрабатываемых препаратов на основе исРНК по сравнению с известными лекарствами, по мнению автора?

2) Что известно про молекулярные механизмы действия доставляющих катионных липосом, которые согласно результатам работы, сами в ряде случаев оказывают биологическое действие? Является ли необходимость их использования препятствием при разработке терапевтических препаратов на основе ТНК?

Указанные вопросы не снижают значимости диссертационной работы и высокой оценки выполненного исследования.

Заключение. Работа Бишани Али соответствует требованиям, установленным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Таким образом, соискатель Бишани Али заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 — “молекулярная биология”.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник лаборатории
регуляции экспрессии генов
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
Институт Цитологии и Генетики СО РАН»,
доктор биологических наук по специальности
03.01.04 – биохимия (биологические науки)

Рыкова Елена Юрьевна
18.09.2024

Подпись д.б.н. Рыковой Е.Ю. заверяю
Ученый секретарь ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии
и генетики СО РАН»

Орлова Г.В.

Адрес места работы:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)
630090, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, д.10
Телефон: +7(383) 363-49-80, Факс: +7(383) 333-12-78
e-mail: rykova.elena.2014@gmail.com