

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Черникова Ивана Вячеславовича «Влияние структуры липофильных конъюгатов малых интерферирующих РНК на их накопление в клетках и биологическую активность *in vitro* и *in vivo*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Актуальность темы исследования, проведенного Черниковым И.В., определяется социальной значимостью терапии онкологических заболеваний, которые являются одной из основных причин заболеваемости, потери трудоспособности и смертности в современном обществе. В современной практике для терапии используются удаление опухоли оперативным путем, стимуляция клеточной смерти под действием радиационного, химиотерапевтического воздействия. Совершенствуются методы молекулярного «типирования» опухолей, которые позволяют более точно выбрать успешную стратегию лечения. Однако зачастую даже агрессивная традиционная терапия приводит к удалению только части злокачественных клеток, ослабляя при этом защитные силы организма. Поэтому разработка новых препаратов для эффективной и малотоксичной противоопухолевой терапии представляет очень важную задачу современной молекулярной биологии.

В качестве одного из перспективных подходов к терапии опухолей сегодня рассматривается применение малых интерферирующих РНК, направленных на избирательное ингибирование генов, ассоциированных с канцерогенезом. Осуществление терапевтического действия препаратов на основе нуклеиновых кислот (НК) зависит от их способности проникать через клеточные барьеры, устойчивости в биологических средах и клетках, специфичности воздействия на мишень. Исследование малых интерферирующих РНК в клеточных культурах и при введении в организм позволило выявить некоторые закономерности, которые определяют дальнейшие пути совершенствования их структуры с целью создания высокоэффективных противоопухолевых препаратов. Диссертационная работа Черникова И.В. посвящена детальному анализу накопления и биологических свойств различных по структуре холестеринowych конъюгатов интерферирующей РНК при их взаимодействии с клетками опухолей в культуре и в организме. Для анализа терапевтического потенциала разрабатываемых препаратов использована siРНК, направленная на подавление гена MDR1, который приводит к развитию устойчивости опухолей к химиотерапии (множественная лекарственная устойчивость, МЛУ).

Представленная на отзыв диссертация построена по традиционному плану, и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы. Диссертационная работа содержит 161 страницу текста, включает 38 рисунков и 7 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 400 литературных источников. Наличие значительного количества ссылок на ранние оригинальные работы (более 10-ти летней давности), а также на современные публикации 3-х последних лет, говорит о тщательном изучении результатов исследований в данной области.

Во введении обосновывается актуальность исследования, формулируются цель и задачи исследования. Цель работы четко сформулирована, 6 задач соответствуют поставленной цели, они успешно решены в ходе работы.

Обзор литературы имеет название «Биоконъюгаты малых интерферирующих РНК», которому полностью соответствует, состоит из 7-ми разделов и заключения. Первые 5 разделов посвящены проблемам и преимуществам использования РНК интерференции для разработки направленных терапевтических подходов, подробно анализируют возможные химические модификации siРНК, а также их влияние на биологическую активность получаемых производных. В 6-й главе Обзора подробно рассматривается возможность использования биоконъюгации как способа улучшения проникновения siРНК в клетки мишени. Текст 6-й главы сопровождается значительной по размеру Таблицей 2 (10 страниц), в которой процитированы работы, основанные на использовании различных биоконъюгатов интерферирующих РНК. Таблица содержит цветные изображения модификаций, внесенных в структуру РНК, структуры присоединенных молекул и краткое описание полученных эффектов. В заключении к Обзору делается основанный на литературных данных вывод о целесообразности разработки новых модификаций нетоксичных биоконъюгатов siРНК, наиболее успешно доставляющих терапевтические препараты к месту их направленного действия в организме.

В главе «Материалы и методы» представлено подробное описание использованных реагентов и методик. Надежность и достоверность полученных результатов определяется тем, что представленная работа выполнена на высоком технологическом уровне с использованием современных методов молекулярно-биологического и биохимического анализа, которые являются адекватными для решения поставленных задач.

Основные результаты отражены в главе 3 «Результаты и обсуждение». Выполненная автором работа является логичным продолжением исследований Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот, где ранее была показана возможность эффективно ингибировать экспрессию гена *MDR1* в клетках KB-8-5 с использованием siРНК D-типа (siD) направленной к району 557 – 577 н. мРНК мишени. В представленной диссертационной работе автор использовал селективно модифицированный аналог этой siРНК, siDm, содержащий 2'-О-метильные звенья в нуклеазочувствительных сайтах. Научная новизна диссертационной работы определяется тем, что Черников И.В. впервые провел комплексное исследование свойств нескольких производных siDm, содержащих холестерин, либо другие липофильные молекулы на 5' или 3' конце смысловой цепи siРНК. Автором получены оригинальные данные о влиянии длины линкера, природы молекулы в составе конъюгата и места ее присоединения на проникновение и накопление siРНК в клетках различных линий и периферических мононуклеарных клетках крови человека. Черников И.В. впервые выявил усиление накопления в клетках производных siDm в ряде случаев при использовании флуоресцентно меченых конъюгатов, при этом наличие флуорофора в составе производного siDm не приводило к усилению биологической активности, либо даже подавляло эту активность. Для изучения биологической активности серии исследуемых конъюгатов автором были созданы модельные линии клеток путем трансдукции лентивирусами, несущими химерный ген, который экспрессирует фрагмент гена *MDR1* и зеленый флуоресцентный белок (GFP) в составе общего транскрипта. Другой подход к оценке биологической активности исследуемых препаратов был основан на анализе уровня продукции Р-гликопротеина методом Вестерн-блот анализа. По результатам работы автор выбрал наиболее перспективный для дальнейшего изучения конъюгат siРНК содержащий остаток холестерина на 5'конце с определенной длиной линкера. По сравнению со свободной siРНК и siРНК в комплексах с Липофектаминоном конъюгат siРНК с холестерином значительно лучше накапливался в опухолях при внутривенном введении мышам линии SCID с

ксенографтной лекарственно устойчивой опухолью человека KB-8-5 и подавлял экспрессию гена-мишени в опухоли в течение нескольких дней после внутривенного, интраперитонеального и перитуморального введения. Этот результат имеет практическую значимость, поскольку изученные автором свойства конъюгата siРНК с холестерином показали перспективность дальнейшего исследования с целью оценки его потенциала для терапии опухолей, характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью.

Диссертационная работа в целом оставляет очень хорошее впечатление, содержит незначительное количество опечаток. Выводы диссертационной работы Черникова И.В. по теме «Влияние структуры липофильных конъюгатов малых интерферирующих РНК на их накопление в клетках и биологическую активность *in vitro* и *in vivo*» основаны на полученных результатах, автореферат диссертации соответствует ее содержанию. По теме исследования опубликовано 6 статей в журналах Перечня ВАК РФ, результаты были представлены на отечественных и международных конференциях. Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертации и автореферата нет.

При анализе собственных результатов настоящей работы возникли дискуссионные вопросы. В связи с выявленным влиянием флуоресцентных молекул на биологические свойства siРНК возникает вопрос о том, насколько адекватным является дальнейшее использование конъюгатов siРНК, содержащих флуорофоры в экспериментах по анализу кинетики распределения и накопления в органах *in vivo*? Присоединение липофильного остатка холестерина к молекуле siРНК вызывает по данным автора значительное накопление конъюгата в ткани печени по сравнению с неконъюгированной siРНК. Можно предполагать, что абсолютное количество siРНК, накопленное в органах, также как и биологический эффект могут изменяться при введении не содержащей остаток флуорофора siРНК по сравнению с siРНК, содержащей гидрофобные остаток флуорофора Cy5.5 или Cy7.

Второй вопрос возникает при анализе результатов сравнительного исследования распределения в организме холестеринового конъюгата siРНК, и той же siРНК без холестерина в двух вариантах – в свободном виде и в составе комплексов с Липофектамином 2000 (Lf). Выбранный автором способ внутривенного введения является обоснованным для холестеринового конъюгата siРНК, однако заведомо не оптимальным для использования комплексов siРНК с Липофектамином. Это закономерно отражается на результатах – siРНК при введении в комплексах с Липофектамином почти полностью накапливаются в почках, выводятся из организма, и не достигают опухоли. Почему в экспериментах по распределению не был выбран другой положительный контроль, обеспечивающий эффективную доставку в организм siРНК без холестерина?

В экспериментах по анализу влияния на уровень Р-гликопротеина использовались различные системы введения конъюгата siРНК с холестерином, при этом не использовалось внутриопухолевое введение и нет данных о сравнении с введением свободной siРНК без холестерина и siРНК без холестерина в составе комплексов с Lf. Возникает третий вопрос, с чем связано отсутствие такого сравнения? Кроме того, уместно было бы привести данные по влиянию бессмысловой последовательности siРНК на уровень Р-гликопротеина.

Закключение. Диссертационная работа Черникова И.В. по теме «Влияние структуры липофильных конъюгатов малых интерферирующих РНК на их накопление в клетках и биологическую активность *in vitro* и *in vivo*» является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научно-практическая задача по выявлению особенностей проникновения в клетки и оказания биологического действия различных по структуре производных малых интерферирующих РНК, что имеет существенное значение для расширения

фундаментальных знаний о механизмах РНК интерференции, и для разработки подходов к конструированию новых эффективных противоопухолевых препаратов на основе нуклеиновых кислот.

Таким образом, по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация Черникова И.В. отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.03 – молекулярная биология, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации, Черников Иван Вячеславович, без сомнения, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаб. молекулярной медицины ИХБФМ СО РАН



Е.Ю. Рыкова

Подпись д.б.н., в.н.с. Е.Ю. Рыковой заверяю:

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН

канд. хим. наук



П.Е. Пестряков

630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук
ИХБФМ СО РАН, Тел.: +7 (383) 363-51-44
E-mail: rykova.elena.2014@gmail.com

19.11.2019