

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
“Государственный научный центр “Институт
иммунологии” Федерального медико-
биологического агентства
чл.-корр. РАН, д.м.н., проф.



М.Р. Хаитов

09 2023 г.

ОТЗЫВ

о научно-практической значимости
диссертации Кнауэр Надежды Юрьевны
«Иммуномодулирующие и противоопухолевые свойства катионных
дендритных молекул и их комплексов с микроРНК»
на соискание учёной степени кандидата медицинских наук
по специальности «3.2.7. Иммунология».

Актуальность темы диссертации

В современных работах активно исследуются возможности новых инструментов, способных одновременно обеспечивать элиминацию опухолевых образований, предотвращение прогрессии и метастазирования путем воздействия на несколько ключевых этапов метаболизма опухолевых клеток и их иммунного микроокружения.

В этом контексте особый интерес представляет исследование свойств мкРНК, класса малых не кодирующих РНК. Их доставка в клетки требует

использования транспортеров, защищающих олигонуклеотиды от деградации в биологических средах. Один из возможных подходов связан с использованием катионных гиперразветвленных полимеров дендримеров, нековалентно связывающих мкРНК и эффективно доставляющих терапевтические нуклеиновые кислоты в клетки различного происхождения. В то же время, на данный момент получено недостаточно данных, описывающих эффекты катионных карбосилановых и фосфорных дендримеров, а также их комплексов с мкРНК, обладающими разными свойствами, на иммунокомпетентные и опухолевые клетки.

Учитывая вышесказанное, изучение иммуномодулирующих и противоопухолевых свойств катионных дендримеров и их комплексов с мкРНК (дендриплексов) является актуальной проблемой.

Таким образом, тема является актуальной, а результаты могут быть основой для разработки комплексов катионных дендримеров с мкРНК (дендриплексов) для дальнейшего изучения функциональной активности иммунокомпетентных и опухолевых клеток.

Соответствие темы диссертации указанной специальности

Тема диссертационной работы полностью соответствует специальности 3.2.7. Иммунология (области исследования: №3 Изучение молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противогрибковой, противопаразитарной иммунной защиты. №6 Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов. №7 Разработка способов воздействия на иммунную систему с помощью фармакологических препаратов и методов иммунобиотерапии. Исследование эффективности и безопасности этих воздействий).

Основные результаты диссертационной работы

Диссертантом был оценен цитотоксический эффект катионных дендримеров 3 поколения – фосфорного (AE2G3) и карбосиланового (BDEF33) на МНПК условно здоровых доноров, произведен расчет IC50. Далее была исследована способность дендримеров транспортировать мкРНК (miR-155, amiR-155) в иммунокомпетентные клетки: было установлено, что дендримеры эффективно доставляют олигонуклеотиды в клетки. На следующем этапе диссертант оценила влияние дендриплексов, содержащих мкРНК-155 и ее антагонист) на жизнеспособность клеток и показала их высокую биосовместимость: дендриплексы не обладали значимым цитотоксическим эффектом, их внесение в культуру не приводило к индукции апоптоза клеток или повышению активности ЛДГ. При исследовании эффектов дендриплексов на иммунокомпетентные клетки было показано наличие умеренного иммуностимулирующего действия комплексов.

При исследовании эффектов дендримеров и их комплексов на опухолевые клетки линий лейкемии и глиобластомы было показано наличие дозозависимого токсического эффекта, сопоставимого с эффектом стандартных химиопрепаратов. Кроме того, было продемонстрировано, что использование дендримеров приводит к резкому повышению числа опухолевых клеток, экспрессирующих маркеры PD-L1, TIM-3, CD47. Диссертантом было показано, что дендримеры способны эффективно транспортировать мкРНК внутрь опухолевых клеток при этом имеют высокий профиль биосовместимости для неопухолевых клеток. Комплексы дендримеров с противоопухолевыми олигонуклеотидами (мкРНК-34, антагонист мкРНК-21) также обладали цитотоксическим эффектом в отношении опухолевых клеток, в то же время экспрессия PD-L1 на их поверхности значимо не менялась.

Результаты этих исследований позволили сделать выводы, что катионные дендримеры могут быть использованы как эффективные транспортеры терапевтических нуклеиновых кислот для задач иммуномодулирующей и противоопухолевой терапии.

Основные результаты диссертации опубликованы в 5 статьях в научных журналах, рекомендованных для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций, в том числе индексирующихся в международных системах цитирования Scopus и Web of Science.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа Кнауэр Н.Ю. представляет собой исследование, которое включает тщательный анализ данных литературы, грамотное планирование экспериментов, применение современных методов, адекватную статистическую обработку полученных данных. Полученные результаты являются достоверными и воспроизводимыми.

Выводы диссертационной работы корректны и логично вытекают из полученных результатов.

Научная новизна

Получены новые знания о биологических свойствах катионных дендримеров на иммунокомпетентные и опухолевые клетки.

Впервые исследован эффект катионных дендримеров 3 поколения и их комплексов с иммуномодулирующими мкРНК на жизнеспособность МНКК условно здоровых доноров. Впервые было проведено исследование интернализации комплексов катионных дендримеров 3 поколения с мкРНК в иммунокомпетентные и опухолевые клетки.

Впервые был исследован эффект дендриплексов на основе катионных дендримеров и мкРНК с иммуномодулирующими свойствами на относительное количество клеток различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток и их пролиферативной активности; экспрессию

поверхностных маркеров CD25, HLA-DR, PD-1; секрецию перфорина и гранзима В; продукцию цитокинов в культуре МНК ПК.

Впервые было проведено исследование цитотоксической активности дендримеров и их комплексов с мкРНК, обладающими противоопухолевыми свойствами (miR-34, amiR-21), в отношении различных опухолевых культур. Впервые были полученные данные о влиянии дендримеров и их комплексов на относительное количество опухолевых клеток, экспрессирующих маркеры, характеризующих взаимодействие опухолевых клеток с иммунным микроокружением.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость работы состоит в том, что было показано, что дендримеры обладают собственным дозозависимым токсическим эффектом, в то время как их комплексы с мкРНК не изменяют значимо показатели жизнеспособности клеток. Было показано, что использование дендриплексов приводит к снижению относительной численности Т-регуляторных клеток, повышению доли клеток, экспрессирующих HLA-DR, PD-1 ($CD4^+HLA-DR^+$, $CD4^+PD1^+$, $CD8^+HLA-DR^+$, $CD19^+PD1^+$), повышению продукции IL-4. В то же время, пролиферативная активность Т-лимфоцитов, показатели относительного количества клеток с 12 фенотипом $CD4^+CD25^+$, $CD8^+CD25^+$, $CD8^+Prf^+$, $CD8^+GrzB^+$, $CD16^+CD56^+Prf^+$, $CD16^+CD56^+GrzB^+$, секреция TNF α и IFN γ значимо не менялись. Были получены данные о влиянии дендримеров и их комплексов на относительное количество опухолевых клеток, экспрессирующих маркеры, характеризующих взаимодействие опухолевых клеток с иммунным микроокружением (PD-L1, TIM-3, CD47): внесение свободных дендримеров повышало относительное количество клеток, экспрессирующих PD-L1, TIM3, CD47, в культурах линий Jurkat (оба дендримера), NCH644 (AE2G3), что может свидетельствовать о наступлении энергетического стресса опухолевых клеток. Внесение исследуемых дендриплексов снижало (тенденция) долю клеток линии GBM1,

экспрессирующих PD-L1.

Научно-практическая значимость работы

Данная работа представляет собой первое доклиническое исследование, в рамках которого были изучены биологические свойства катионных дендримеров и их комплексов с иммуномодулирующими и противоопухолевыми мкРНК.

Научно-практическая значимость работы заключается в том, что были охарактеризованы биологические свойства фосфорного и карбосиланового дендримеров 3 поколения AE2G3 и BDEF33, а также их комплексов с терапевтическими олигонуклеотидами в отношении иммунокомпетентных и опухолевых клеток (Jurkat, BTSC233, JHH520, NCH644, GBM1, U87), а именно исследован эффект катионных дендримеров 3 поколения (AE2G3, BDEF33) и их комплексов с иммуномодулирующими мкРНК (miR-155, amiR-155) на жизнеспособность моноклеарных клеток периферической крови условно здоровых доноров, произведена оценка IC50 исследуемых дендримеров. На основании полученных данных был сделан вывод, что дендримеры обладают токсическим эффектом, более выраженным для фосфорного дендримера AE2G3, а их комплексы не изменяют значимо относительную жизнеспособность МНКК, активность ЛДГ в культуре МНКК, индукцию апоптоза CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Исследование интернализации комплексов катионных дендримеров 3 поколения с мкРНК в иммунокомпетентные и опухолевые клетки, показало, что дендримеры имеют различную эффективность интернализации в разных моделях: BDEF33 является более эффективным транспортером для доставки мкРНК в иммунокомпетентные клетки, в отношении опухолевых клеток доставка происходит более эффективно при использовании AE2G3. Данные исследования могут быть применены для разработки новых терапевтических подходов в области лекарственной доставки в иммунотерапии и онкологии, в

том числе для создания препаратов, обладающих высоким сродством к субпопуляции опухолевых стволовых клеток

Был выявлен ряд эффектов дендриплексов на основе катионных дендримеров и мкРНК с иммуномодулирующими свойствами на относительное количество клеток различных субпопуляций, иммунокомпетентных клеток ($CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{low}$, $CD19^+$, $CD14^+$, $CD16^+CD56^+$) и их пролиферативной активности ($CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ клетки); экспрессию поверхностных маркеров CD25, HLA-DR, PD-1 (относительное количество позитивных клеток среди субпопуляций $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ и $CD19^+$ клеток); секрецию перфорина и гранзима В (субпопуляции $CD3^+CD8^+$, $CD16^+CD56^+$); продукцию цитокинов в культуре МНК ПК (IL-4, IL-10, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$). Было показано, что использование дендриплексов приводит к снижению относительной численности Т-регуляторных клеток, повышению доли клеток, экспрессирующих HLA-DR, PD-1 повышению продукции IL-4. При этом не было выявлено значимых эффектов на пролиферативную активность Т-лимфоцитов и секрецию $TNF\alpha$ и $IFN\gamma$.

Было выявлено, что опухолевые стволовые клетки глиобластомы имели большую чувствительность к дендримерам, чем клетки линии U87.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

В связи с тем, что по результатам исследования дендримеры показали свою эффективность как в качестве самостоятельных противоопухолевых агентов, так и в качестве носителей терапевтических мкРНК, они становятся перспективным объектом исследования для последующего создания терапевтических препаратов, в которых они будут использованы либо в качестве активной фармацевтической субстанции, либо в качестве вспомогательного вещества – носителя. Использование катионных дендримеров может быть положено в основу создания платформы для

производства лекарственных средств, направленных на лечение онкологических заболеваний.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация изложена на 127 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц, 39 рисунков. Диссертация включает главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список использованной литературы». Библиография включает 322 источника, все из которых на иностранном языке.

В главе «Введение» обоснованы актуальность, научная новизна, практическая значимость исследования, а также сформулированы цель и задачи работы.

В главе «Обзор литературы» рассматриваются современные подходы к использованию мкРНК для задач иммунотерапии и противоопухолевой терапии, описываются различные типы наноразмерных носителей для терапевтических олигонуклеотидов, излагаются современные представления о возможностях использования дендримеров в терапевтических целях. Обзор литературы написан грамотным литературным языком, демонстрирует высокий уровень знания современной научной литературы по данной теме.

В главе «Материалы и методы» изложена полная информация об объектах исследования и использованных в работе методических подходах. Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне с применением современных методов, используемых в иммунологии.

Глава «Результаты собственных исследований» включает описание полученных автором данных, характеризующих:

1. Цитотоксичность дендримеров и дендриплексов в отношении иммунокомпетентных и опухолевых клеток;
2. Способность дендриплексов проникать в иммунокомпетентные и опухолевые клетки;

3. Эффекты дендримеров и дендриплексов на иммунокомпетентные клетки: изменение фенотипического состава и пролиферативной активности; относительное количество клеток, экспрессирующих маркеры CD25, HLA-DR, PD-1; секреция перфорина и гранзима В; продукция цитокинов в культуре МНК ПК.

4. Влияние дендримеров и дендриплексов на показатели, характеризующие взаимодействие опухолевых клеток с иммунным микроокружением: относительное количество клеток, экспрессирующих PD-L1, TIM-3, CD47; продукция IL-10.

Все результаты получены с помощью современных методов исследования, проверены в достаточном количестве экспериментальных повторностей, их достоверность статистически подтверждена, сопровождаются рисунками и таблицами.

В главе «Обсуждение» автор проводит анализ полученных результатов, сравнивает полученные результаты с данными литературы и аргументированно раскрывает их научную значимость.

Сделанные в работе выводы корректны, полностью обоснованы результатами проведенного исследования. Работу завершает список использованной литературы, включающий 322 источника. Оформление диссертации соответствует установленным требованиям.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Кнауэр Надежды Юрьевны «Иммуномодулирующие и противоопухолевые свойства катионных дендритных молекул и их комплексов с микроРНК» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «3.2.7. Иммунология» является научно-квалификационной работой, в которой решены задачи, важные для иммунологии: показано, что катионные дендримеры обеспечивают эффективную доставку терапевтических

олигонуклеотидов в иммунокомпетентные и опухолевые клетки, при этом комплексы катионных дендримеров с иммуномодулирующими мкРНК не оказывают цитотоксического эффекта на иммунокомпетентные клетки и обладают иммуностимулирующим эффектом; доказано, что катионные дендримеры и их комплексы с мкРНК, имеющими противоопухолевую активность, стимулируют гибель опухолевых клеток.

Диссертация Кнауэр Н.Ю. полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года в редакции постановления Правительства РФ от октября 2018 г №1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности «3.2.7. Иммунология».

Отзыв обсужден и утвержден на расширенном заседании лаборатории противовирусного иммунитета Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (протокол №2 от 14.09. 2023 г.).

ФГБУ "ГНЦ Институт иммунологии" ФМБА России

115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

e-mail: info@ncii.ru

Тел: +7 499 617 79 22

Зам. директора по науке и инновациям, Д.Б.Н.



Шиловский И.П.

14.09. 2023 г

Даю согласие на обработку моих персональных данных .