

ОТЗЫВ

официального оппонента Карпенко Ларисы Ивановны на диссертационную работу Кнауэр Надежды Юрьевны «Иммуномодулирующие и противоопухолевые свойства катионных дендритных молекул и их комплексов с микроРНК», представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности «3.2.7 – Иммунология»

Актуальность темы

Тема диссертационной работы Кнауэр Надежды Юрьевны, несомненно, является актуальной, и посвящена исследованию противоопухолевого потенциала ряда микроРНК. В настоящее время уже не вызывает сомнений огромная важность микроРНК как универсальных регуляторов экспрессии генов, которые, как выяснилось, регулируют экспрессию примерно 1/3 генома и вызывают изменения в основных сигнальных путях и в метаболизме. Растёт число работ, посвящённых исследованиям микроРНК при онкологических заболеваниях человека, изучению механизмов действия, их прямого или опосредованного участия в модулировании клеточных сигнальных путей и определения роли в процессах опухолевого роста. МикроРНК, имеющие своими мишенями наиболее важные этапы клеточного цикла, могут быть перспективным инструментом для задач противоопухолевой терапии.

Серьёзной проблемой является доставка микроРНК, которая связана с их быстрой деградацией в биологических средах. Внесение химических модификаций, снижающих распознавание нуклеазами, частично решает эту проблему, однако, потенциально может и ухудшать связывание микроРНК с таргетными последовательностями. Сегодня с проблемой доставки столкнулись многие разработчики терапевтических средств, полученных на основе нуклеиновых кислот - ДНК- и РНК-вакцин. Липосомы, которые были использованы для доставки мРНК-вакцин против COVID-19, как оказалось, вызывают достаточного много побочных эффектов. В связи с этим чрезвычайно актуальным является поиск новых эффективных средств доставки нуклеиновых кислот.

Среди перспективных молекул для доставки микроРНК рассматриваются катионные дендримеры - новый класс полимеров, активно исследуемый в настоящее время. В своей диссертационной работе Надежда Юрьевна представила оригинальные данные, демонстрирующие возможность доставки микроРНК, обладающих противоопухолевым потенциалом, с помощью катионных дендримеров.

Научная новизна и практическая значимость

Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнений. Автором впервые была проведена оценка эффекта катионных дендримеров и их комплексов с микроРНК на иммунокомпетентные клетки. Так, было показано, что несмотря на наличие собственного токсического эффекта, дендримеры в составе комплексов с терапевтическими олигонуклеотидами эффективно проникают в моноклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) условно здоровых доноров, не приводя к клеточной гибели и оказывая слабый иммуномодулирующий эффект. В то же время дендримеры обладают собственным цитотоксическим действием в отношении клеток опухолевых линий, а внесение их в опухолевую культуру приводило к повышению числа клеток, экспрессирующих маркеры PD-L1, CD47, TIM-3.

Таким образом, представленные данные вносят важный вклад в область фундаментальных знаний о биологических свойствах дендримеров, впервые раскрывая воздействие катионных дендримеров на иммунокомпетентные клетки. Практическая ценность данной работы подчеркивается выбором композиций наноформуляций дендример:микроРНК и исследованием их потенциала в терапевтическом контексте.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов

Достоверность и обоснованность данных, полученных в диссертационном исследовании, обеспечивается подробным описанием методов исследования, продуманным дизайном работы, использованием адекватных статистических методов обработки полученных данных. Эксперименты проведены в соответствии с целью и задачами исследования. Выводы диссертации основаны на полученных результатах.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на российских (Отчётные конференции аспирантов и ординаторов НИИФКИ) и международных конференциях (конгрессы EAACI, ESMO, EHA и т.д.); опубликованы в 5 печатных работах в журналах, индексирующихся в базе Scopus и Web of Science и рекомендованных ВАК РФ.

Общая оценка диссертации

Диссертация написана в традиционном стиле на 127 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 15 таблицами и 39

рисунками. Список литературы содержит библиографические данные о 322 работах отечественных и зарубежных авторов.

Во введении автором убедительно обосновывается актуальность исследования, указаны цель и задачи, научная новизна и научно-практическая значимость исследования, изложены основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературных данных представляет собой анализ проведённых исследований по теме диссертации. Автор изложил современные данные о роли микроРНК в регуляции взаимодействия опухоли и иммунной системы, проанализировал современные подходы к доставке терапевтических олигонуклеотидов. Обзор написан хорошим литературным языком, демонстрирует глубокое понимание автором темы.

Во второй, третьей и четвертой главах описаны методы исследования, основные результаты исследования и их обсуждение. В работе используется широкий спектр современных методологических подходов, которые могут быть легко воспроизведены.

В первой части главы "Результаты собственных исследований" автор описывает эффекты катионных дендримеров и их комплексов с иммуномодулирующими микроРНК на иммунокомпетентные клетки: их жизнеспособность, фенотипический состав, экспрессию периферических маркеров и секрецию цитокинов. Вторая часть главы посвящена исследованию влияния катионных дендримеров и микроРНК с противоопухолевой активностью (микроРНК-34, а-микроРНК-21) на клетки опухолевых линий лейкемии и глиобластомы (в том числе, линий опухолевых стволовых клеток глиобластомы).

В разделе "Обсуждение" автор полноценно анализирует полученные результаты и их соответствие современным мировым данным. Итоги работы подведены в Заключение.

Положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют полученным результатам, выводы свидетельствуют о достижении поставленной соискателем цели.

Вопросы и замечания

При прочтении диссертации возникло несколько вопросов, которые в основном носят дискуссионный характер:

1. Замечание к предложению на стр. 12 в разделе "Научная новизна полученных результатов и практическая значимость", в котором диссертант утверждает, что *"Данное исследование представляет собой первую доклиническую характеристику биологических свойств катионных дендримеров и их комплексов с иммуномодулирующими и противоопухолевыми микроРНК."* В данном предложении не корректно использован термин – "доклиническая характеристика". Классическое

понимание этого термина включает исследования стандартизованного препарата на культуре клеток и на нескольких видах животных. В диссертации представлены результаты исследования экспериментальных веществ на культуре клеток (*in vitro*).

2. Чем можно объяснить тот факт, что комплексы дендримеров с микроРНК становятся менее токсичными для клеток, чем сами свободные дендримеры?
3. В ряде исследований [Chan, Krichevsky, Kosik, 2005; Lawrie, 2013] [Brodskiy и др., 2019] показано, что повышенная экспрессия PD-L1 и CD47 связана с устойчивостью опухолей к химиопрепаратам. Автором продемонстрировано, что дендримеры/дендриплексы повышают экспрессию PD-L1 и CD47 на опухолевых клетках, но при этом вызывают выраженный противоопухолевый эффект. ВОПРОС: Чем можно объяснить эти противоречивые данные?
4. Чем объяснить достоверный рост клеток Jurkat при добавлении дендримера AE2G по сравнению с необработанным контролем при концентрации 0,1 и 1 микромоль (рисунок 3-14.)? Как можно объяснить сильный токсический эффект дендримера AE2G при дозе 10 микромолей?
5. Диссертантом показано, что дендримеры AE2G3 и BDEF33 обладают токсичностью в отношении линий опухолевых клеток. В частности клеточные линии глиобластомы проявляли высокую чувствительность к исследуемым дендримерам, даже большую чем к темозоломиду, классическому препарату, используемому в химиотерапии глиобластомы. ВОПРОС: Можно ли рассматривать дендримеры в качестве потенциального средства для терапии глиомы?

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования и не снижают высокой положительной оценки работы.

Заключение

Диссертационная работа Кнауэр Надежды Юрьевны «Иммуномодулирующие и противоопухолевые свойства катионных дендритных молекул и их комплексов с микроРНК» представленная на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности «3.2.7 – Иммунология» является самостоятельной завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком уровне и представляющим интерес для решения задач современной иммунотерапии опухолевых заболеваний.

Диссертация Кнауэр Н.Ю. соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении учёных 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 учёной степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности «3.2.7 – Иммунология».

Официальный оппонент:

Заведующая лабораторией рекомбинантных вакцин

Федерального бюджетного учреждения науки
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
доктор биологических наук



Карпенко Лариса Ивановна

Адрес: 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, Федеральное бюджетное учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Эл. почта karpenko@vector.nsc.ru,
телефон: +7 (383) 363-47-10

Сайт: <http://www.vector.nsc.ru/>

Подпись Карпенко Л.И. заверяю:

Начальник отдела кадров

ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора



И.В. Ильин

28.09.2023 г.