

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Уваровой Виктории Игоревны
«Разработка системы доставки малых интерферирующих рибонуклеиновых кислот
на основе функционализированных липидами магнитных наночастиц»,
представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 1.5.6 – «Биотехнология»

Подавление экспрессии целевых генов с помощью малых интерферирующих рибонуклеиновых кислот (миРНК) ведет к снижению биосинтеза специфического белка, что оказывает терапевтический эффект в случае ряда генетических нарушений. Несмотря на современные достижения в области разработки невирусных систем доставки, основными препятствиями на пути к безопасной и эффективной генной терапии остаются низкая адресность доставки в клетки, неэффективность преодоления миРНК клеточной мембраны и ее высвобождения в цитозоль для оказания терапевтического эффекта. Поэтому поиск новых подходов к трансфекции, которые позволят преодолеть существующие ограничения и добиться широкого внедрения РНК-терапии в клиническую практику, является актуальной как фундаментальной, так и практической задачей.

Диссертационная работа Уваровой В.И. посвящена разработке технологии эффективной системы доставки миРНК в клетки для снижения уровня экспрессии гена-мишени. Наличие магнитного ядра в системе доставки позволяет осуществлять неинвазивное удаленное управление носителем с помощью внешнего магнитного поля, повышая эффективность трансфекции.

Работа Уваровой В.И. построена традиционным образом. Она включает в себя список сокращений и условных обозначений (важный раздел, помогающий чтению текста), введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, благодарности и перечень цитируемой литературы. Диссертация изложена на 141 странице, содержит 49 рисунков и 10 таблиц, список цитируемой литературы состоит из 316 ссылок.

Во **введении** показана актуальность работы, сформулирована ее цель и задачи, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость проведенных исследований, а также положения, выносимые на защиту.

В **обзоре литературы** диссертант рассматривает опубликованные данные по некодирующим РНК, на основе которых разрабатываются препараты для специфической регуляции генов, их основным мишеням в терапии сердечно-сосудистых заболеваний и достижениям в области систем доставки этих терапевтических агентов. Особое внимание в обзоре уделено магнитным частицам нанометрового диапазона (наночастицам или НЧ) и их биомедицинскому применению в качестве средств доставки нуклеиновых кислот, в том числе использованию внешнего магнитного поля для повышения эффективности трансфекции. Автор систематически приводит основные методы синтеза магнитных НЧ, подробно разбирает особенности формирования таких структур и рассматривает влияние различных параметров, таких как температура, тип растворителя и поверхностно-активных веществ на процесс формирования НЧ. Отдельный раздел литературного обзора посвящён рассмотрению поведения магнитных НЧ во внешнем переменном магнитном поле и его использование в наномедицине. Обращает на себя внимание значительное количество работ, рассмотренных диссертантом (316 источников), что свидетельствует о широком знании литературы в области, выбранной для диссертационной работы. Обзор хорошо структурирован, наглядно иллюстрирован и дает читателю необходимую информацию о состоянии дел в обсуждаемой области.

В разделе **Материалы и методы** описаны использованные материалы, реактивы, оборудование, миРНК, клеточные линии и животные модели. В этом же разделе приведены методики синтеза прекурсора и НЧ, функционализации НЧ и загрузки терапевтического агента, определения цитотоксичности образцов, проведения трансфекции, выделения и очистки РНК, электрофореза, проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени и исследования полученных комплексов на животных. Методическая часть диссертационной работы написана подробно и может быть воспроизведена в других лабораториях для решения подобных научных задач.

В разделе **Результаты и обсуждение** описано выполненное диссертантом комплексное междисциплинарное исследование, которое включает химический синтез НЧ оксида железа различных форм и размеров, исследование их физико-химических свойств методами просвечивающей электронной микроскопии,

рентгенофазового анализа и др., модификацию полученных НЧ природными и синтетическими липидами, формирование комплексов терапевтических миРНК с НЧ и тестирование полученных комплексов на клеточных культурах и животных моделях. Следует отметить логичное построение проведенного автором исследования, в ходе которого для выполнения следующего этапа работы отбирались кандидаты, показавшие наилучшие результаты.

Основные результаты работы состоят в следующем.

1. Разработан двухстадийный метод синтеза магнитных НЧ, позволяющий контролируемо менять их размер. Меняя условия синтеза, можно получать НЧ различной формы (сферы, кубы, октапеды), что существенно для последующей функционализации наночастиц липидами и их загрузки миРНК.

2. В экспериментах *in vitro* показано, что эффективность ингибирования экспрессии гена-мишени под действием комплекса НЧ-миРНК сопоставима с действием современного реперного трансфецирующего агента Липофектамина, при этом комплекс НЧ-миРНК не демонстрирует цитотоксического действия в концентрациях необходимых для проведения трансфекции.

3. В экспериментах *in vitro* показано, что использование внешнего низкочастотного переменного магнитного поля усиливает накопление комплекса НЧ-миРНК в клетках, что приводит к дополнительному повышению ингибирования экспрессии матричной РНК гена-мишени.

4. Исследовано биораспределение комплексов в органах и тканях лабораторных животных. При внутривенном введении практически 100% наночастиц регистрируются в печени; высокий уровень НЧ в печени сохраняется по крайней мере в течение 2 суток после введения препарата.

5. Внутривенное введение комплекса НЧ-миРНК приводит к снижению уровня общего холестерина в сыворотке, что косвенно указывает на ингибирование экспрессии мРНК гена-мишени, ответственного за накопление холестерина.

Вопросы и замечания к диссертации В.И.Уваровой.

1. Каковы перспективы практического медицинского использования комплексов НЧ-миРНК, в составе которых есть катионные компоненты (липиды)? Или их использование ограничено экспериментами *in vitro*?

2. Что представляет собой слой липидов на поверхности НЧ – это монослой, бислой, несколько бислоев и т.д.?

3. Стр. 86: В тексте работы сказано: «... полученные ЛНЧ являются мицеллами, во внутренней структуре которых располагаются 3-5 НЧ». Каким образом была установлена мицеллярная структура ЛНЧ и каким методом оценивали количество включенных в него магнитных наночастиц?

4. Стр. 88: «После адсорбции, не оставаясь на поверхности частиц, молекулы миРНК могут претерпевать конформационные перестройки внутри липидного покрытия, состоящего из нескольких слоев...». Каков возможный механизм проникновения отрицательно заряженной молекулы миРНК в гидрофобную часть липидного покрытия?

5. Из данных рисунков 3.14-Б и 3.14-В следует, что нейтрализация поверхностного заряда ЛНЧ добавленной миРНК происходит при соотношении масс C12-200:РНК=1,3. При соотношении 0,1 в системе присутствует 10-кратный избыток РНК. За счет чего этот избыток связывается с ЛНЧ?

6. Рисунок 3.36, столбики для клеток Huh7: Эффективность ингибирования экспрессии целевого гена добавленным комплексом ЛНЧ-миРНК уменьшается во времени – после 6-часовой инкубации она ниже, чем она после 2-часовой. Почему?

7. Как готовили комплексы Lipofectamine 3000 с миРНК? Каким было соотношение компонентов комплекса?

8. Составы комплексов ЛНЧ-миРНК для биологических экспериментов? Они были получены в недостатке или в избытке миРНК?

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Материал диссертации изложен логично, выводы убедительны, соответствуют полученным экспериментальным данным и подкреплены анализом литературы. Большой объем проделанной экспериментальной работы и тщательный анализ полученных данных определяют достоверность и обоснованность сделанных автором заключений. Полученные автором результаты опубликованы в 7 работах, в том числе 2 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus и рекомендованных для защиты в диссертационном совете, и 5 патентах на изобретение. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации.

Диссертация отвечает требованиям, определенными пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Диссертационная работа Уваровой В.И. по своей актуальности, полученным экспериментальным данным, научной новизне и практической значимости полностью соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертационным работам, а ее автор Уварова Виктория Игоревна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 – «Биотехнология».

Официальный оппонент:

доктор химических наук, профессор,

член-корреспондент РАН,

заведующий кафедрой высокомолекулярных соединений

химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Ярославов Александр Анатольевич

10.06.2022

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 939-55-83, e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

Адрес места работы:

119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40,

МГУ имени М.В. Ломоносова