

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Бродской Александры Валерьевны на тему:

«Разработка противовирусной композиции малых интерферирующих РНК для ингибирования репродукции вируса гриппа А», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – Вирусология

Грипп является серьезной массовой и неуправляемой инфекцией, которая ежегодно регистрируется в различных частях земного шара. Среди различных типов вирусов гриппа вирус гриппа А наименее эволюционно устойчив и представляет наибольшую угрозу здоровью населения и серьезную проблему для здравоохранения. По данным ВОЗ в эпидемические сезоны гриппом заболевает до 10% населения земного шара (примерно 500 млн. чел.), а при возникновении пандемий число заболевших увеличивается в 4-5 раз. Во время трех пандемий XX века в человеческой популяции распространились вирусы гриппа А подтипов H1N1 (1918), H2N2 (1957) и H3N2 (1968). Первая пандемия XXI века была вызвана вирусом подтипа H1N1, который отличался существенно от вирусов, циркулировавших ранее, поскольку имел совершенно новый генетический состав, приобретенный в результате ряда реассортаций. Помимо «привычных» для человека подтипов вируса гриппа А (H1, H2, H3) в XXI столетии были неоднократно зарегистрированы «заносы» из природных резервуаров (в основном, птичьих) нехарактерных для человека подтипов H5, H7, H9, H6, H13. Для таких вирусов иммунитет у людей отсутствует абсолютно, а клиническая картина заболевания сопровождается серьезными осложнениями, в том числе со стороны нервной системы. Процент летальных исходов в случае инфицирования штаммами подтипа H5 достигал 60%. В связи с этим не вызывает сомнения возросшая в последние десятилетия актуальность поиска противовирусных реагентов широкой специфичности, подавляющих размножение вирусов различного антигенного состава. Разработка высокоэффективных препаратов нового поколения, способных обойти проблему лекарственной резистентности, напрямую связана с поиском способов таргетной и биобезопасной доставки препаратов непосредственно к клеткам-мишеням.

В Отделе молекулярной биологии вирусов Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, где была спланирована и выполнена представленная к защите работа А.В. Бродской, давно и успешно занимаются разработкой новых противовирусных стратегий. Рассматриваемая работа соискателя является логическим продолжением данного направления исследований.

Разностороннее исследование, проведенное А.В. Бродской, включает в себя решение нескольких логически связанных задач, объединенных общей целью поиска и экспериментальной характеристики различных систем доставки малых интерферирующих РНК (миРНК) и их композиций для ингибирования экспрессии генов вируса гриппа А человека *in vitro*. В рамках исследования был проведен биоинформатический подбор нескольких кандидатных миРНК, направленных на консервативные области геномных сегментов PA и NP вируса гриппа А человека. Кандидатные миРНК были синтезированы и охарактеризованы с точки зрения их противовирусной активности при внутриклеточной доставке по протоколу с использованием липофектамина. Из спектра предсказанных миРНК на этом этапе были отобраны две молекулы, обладающие наиболее выраженной противовирусной активностью. Последующая работа развивалась в русле поиска более эффективных и биобезопасных способов доставки. Автором впервые проведено сравнение внутриклеточной доставки и противовирусной активности миРНК в комплексе с ранее предложенными носителями (полиэтиленимином, производными хитозана, липофектаминоном), а также гибридными полиэлектролитными микрокапсулами, которые действуют по новому принципу. Автором было показано, что гибридные SiO<sub>2</sub>-микрокапсулы, которые по данным электронно-микроскопического исследования представляют собой овальные полые структуры, обладают высокой инкапсулирующей активностью в отношении различных миРНК, в результате чего достигалась высокая концентрация действующего вещества внутри капсулы. Обнаружено, что такие капсулы обеспечивают эффективную и быструю трансфекцию миРНК и их полное высвобождение в цитоплазму клетки уже через 24 ч после введения. Крайне важно с точки зрения будущего фармацевтического использования подобных препаратов наблюдение автора, что данный носитель (в отличие от других) обладает низкой цитотоксичностью и обеспечивает длительную защиту миРНК от деградации. Наконец, соискателем разработана уникальная композиция из нескольких миРНК, направленных на подавление экспрессии генов PA, NP и NS вируса гриппа А, которая, будучи заключенной в препарате микрокапсул, обеспечивает высокоспецифичную противовирусную защиту в отношении вирусов гриппа А подтипов H1N1, H1N1<sub>pdm09</sub>, H5N2, H7N9. Эффективность ингибирования вирусной репродукции в случае профилактического введения препарата, содержащего три или более разных миРНК, оказалась выше, чем эффективность каждого препарата в отдельности. Широкий спектр подтипов поверхностных антигенов, против которых действует предложенная композиция, в том числе подтипов гемагглютинина H5 и H7, для которых в настоящее время нет вакцинных препаратов, крайне актуально с точки зрения предотвращения распространения высоко патогенных штаммов нехарактерных для человеческой популяции подтипов.

## Заключение

Проведенная соискателем большая и тщательная экспериментальная работа с использованием различных лабораторных подходов, а также приемов биоинформатики представляет огромный интерес с точки зрения фундаментального понимания механизмов патогенеза вируса гриппа и, кроме того, содержит ярко выраженную прикладную составляющую. Предложенные автором подходы эффективной внутриклеточной доставки миРНК посредством гибридных микрокапсул, поверхность которых может быть при необходимости модифицирована для достижения большей биосовместимости, биodeградируемости и таргетности доставки, могут быть рекомендованы для разработки фармацевтических препаратов различного назначения и, в первую очередь, эффективных противовирусных препаратов нового поколения. По актуальности, объёму выполненных исследований, методическому уровню, научной новизне и практической значимости полученных результатов настоящая работа полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней...», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор – Бродская Александра Валерьевна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – Вирусология.

Ведущий научный сотрудник  
отдела хроматографического анализа  
НИИ физико-химической биологии  
имени А.Н. Белозерского  
ФГБОУ ВО «Московский государственный  
университет имени М.В.Ломоносова» (МГУ),  
д.б.н.

Кордюкова Лариса Валентиновна

Подпись д.б.н. Л.В.Кордюковой заверяю  
Ученый секретарь  
НИИ физико-химической биологии  
имени А.Н.Белозерского МГУ,  
д.ф.-м.н.



Фетисова Зоя Григорьевна

« 31 » мая 2018 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Научно-исследовательский Институт имени А.Н.Белозерского. Москва 119991, Ленинские горы, д.1, стр.40. Тел.: +7(495)9395359 (канцелярия). Сайт: [www.belozersky.msu.ru](http://www.belozersky.msu.ru) E-mail: [kord@belozersky.msu.ru](mailto:kord@belozersky.msu.ru)