

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Директор

Федерального государственного бюджетного  
учреждения «Национальный исследовательский  
центр эпидемиологии и микробиологии  
им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России  
доктор биологических наук, профессор, академик РАН  
А.Л. Гинцбург



### **ОТЗЫВ**

ведущего учреждения, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, о научно-практической значимости диссертационной работы **Бродской Александры Валерьевны** «Разработка противовирусной композиции малых интерферирующих РНК для ингибирования репродукции вируса гриппа А», на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология, представленной к защите в диссертационный совет Д 001.043.01 при ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» МЗ РФ

#### **Актуальность темы выполненной работы.**

Спектр современных средств, используемых для специфической профилактики и лечения гриппозной инфекции, включает вакцины и химиопрепараты, механизм действия которых направлен на отдельные циклы репродукции вируса в организме восприимчивого хозяина. Последние достижения современной науки о структуре и функциях белков вируса гриппа позволяют целенаправленно применять подходы к созданию лекарственных препаратов нового поколения, одним из которых является использование ингибиторов вирусной репродукции на основе малых интерферирующих РНК (миРНК).

РНК-интерференция – это клеточный процесс посттранскрипционного подавления экспрессии генов при помощи малых двуцепочечных молекул РНК путём деградации целевой мРНК, ее деаденилирования, или блокировки трансляции соответствующего белка. Система РНК-интерференции очень консервативна у эукариот и играет важную роль в защите клеток от вирусов.

Исследования, направленные на изучение такого терапевтического подхода для блокирования репликации коронавируса, вируса гриппа, вируса парагриппа и РС-вируса показали, что технология РНК-интерференции является эффективной и перспективной [Kaczmarek J.C. et al., 2017; Khanna M. et al., 2015; Varik S., 2010].

Малые интерферирующие РНК имеют ряд неоспоримых преимуществ перед традиционными препаратами, среди которых - высокая специфичность, профилактическая и лечебная эффективность, интраназальный путь введения, возможность оперативного синтеза модифицированных миРНК и их комбинирования. Однако остается и ряд вопросов, требующих дальнейших исследований, в частности, продолжительность их функционально активного состояния, безопасных и эффективных систем доставки миРНК в клетки-мишени. Создание систем доставки на основе искусственно синтезируемых микро- и наноносителей является одним из наиболее перспективных направлений в связи с широкими возможностями по их дизайну, химическому составу, физико-химическим свойствам, возможностям масштабирования их синтеза.

Диссертационная работа Бродской Александры Валерьевны посвящена исследованию противовирусного действия препаратов миРНК, направленных на подавление экспрессии генов вируса гриппа типа А (ВГА), с использованием различных систем невирусной доставки *in vitro*. Цель работы заключалась в разработке новых современных подходов к терапии гриппа на основе использования механизма РНК-интерференции и сопутствующее ей решение задачи высокоэффективной и безопасной внутриклеточной доставки малых интерферирующих РНК *in vitro*. Разработка такого подхода является

достаточно актуальной для современной вирусологии задачей, в следствие развивающейся резистентности вирусов гриппа А к существующим препаратам.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, их достоверность и новизна.**

Рассматриваемая диссертация содержит новые данные, полученные с помощью классических методов вирусологии и современных методов молекулярной и клеточной биологии. Автором проведен подбор миРНК, направленных на подавление экспрессии генов полимеразы (РА) и нуклеопротеина (NP) вируса гриппа А, и первичный скрининг их противовирусного действия *in vitro* в комплексе с липофектаминоном. Также проведены эксперименты по подбору параметров и характеристике комплексов миРНК с поликатионными носителями, сравнительное исследование эффективности доставки, опыты *in vitro* по определению противовирусной активности препаратов миРНК.

Автор выявила противовирусную активность синтетических миРНК РА-1630, NP-717, NP-1004 и NP-1341, направленных на консервативные области РА и NP. Более высокий противовирусный эффект установлен при применении комбинации из трех инкапсулированных в гибридные SiO<sub>2</sub>-МК миРНК. Показана защитная эффективность гибридных SiO<sub>2</sub>-МК в отношении инкапсулированных миРНК.

Полученные результаты диссертационного исследования могут быть использованы как для разработки новых противовирусных препаратов, так и других препаратов с микрокапсульной системой внутриклеточной доставки.

**Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации.**

В процессе выполнения диссертационного исследования впервые подобраны миРНК, направленные на «выключение» экспрессии генов ВГА,

кодирующих белки NP, PA, PA-N155, PA-N182 и PA-X, и обладающие противовирусной активностью в опытах *in vitro*. Впервые проведено сравнительное исследование эффективности внутриклеточной доставки и противовирусного действия в отношении ВГА препаратов миРНК с различными невирусными носителями. В данной работе продемонстрировано эффективное применение композиции миРНК с микрокапсульными носителями для эффективного подавления репродукции ВГА *in vitro*. Таким образом, в результате выполнения диссертационного исследования была разработана не имеющая прямых аналогов противовирусная композиция, представляющая собой комбинацию из трех миРНК, для подавления экспрессии генов PA, NP и NS ВГА, инкапсулированных в гибридные полиэлектролитные микрокапсулы с поверхностью, модифицированной частицами SiO<sub>2</sub>.

**Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах.**

Диссертационная работа Бродской А.В. является завершенной научно-квалификационной работой и посвящена разработке прототипа противовирусного препарата на основе малых интерферирующих РНК с носителем. Работа может быть условно разделена на две части: сравнительное исследование различных носителей для доставки миРНК в клетки и оценка противовирусного потенциала композиции миРНК в микрокапсулах для ингибирования репродукции ВГА *in vitro*. Работа представляет собой цельное многостороннее исследование, написана доступным языком и хорошо структурирована. Для обзора литературы использованы современные данные, большинство источников опубликовано за последние 5 лет. Материалы результатов исследований представлены четко и логично, в достаточной степени иллюстрированы рисунками и таблицами. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Результаты диссертационной работы были опубликованы автором в 20 печатных работах, 6 из которых – в журналах, рекомендованных ВАК, а также материалах российских и зарубежных конференций. Опубликованные данные полностью соответствуют представленным в диссертационной работе результатам. Очевиден личный вклад автора, как в экспериментальной части исследований, так и на аналитическом этапе.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.**

Несмотря на то, что проведенные соискателем исследования носят фундаментальный характер, сама проблема и полученные результаты могут представлять практический интерес. В частности, миРНК могут быть использованы для разработки профилактических и лечебных препаратов на их основе, обладающих широким спектром активности в отношении разных антигенных вариантов вируса гриппа А как человека, так и птиц.

Предложенные в работе подходы по эффективной внутриклеточной доставке миРНК с помощью гибридных микрокапсул, поверхность которых может быть при необходимости модифицирована с целью достижения большей биосовместимости, биodeградируемости, эффективности и таргетности доставки, представляют особое направление исследований для разработки новых фармацевтических препаратов различного действия.

### **Замечание (вопрос).**

При детальном ознакомлении с материалами диссертации возникли некоторые замечания.

1. стр.98, рис.3.28. В тексте диссертационной работы к этому рисунку сказано о подавлении репродукции вирусов гриппа в культуре клеток MDCK на 2-4lg ТЦД50, оцениваемой по показателям инфекционных титров комбинацией из трех инкапсулированных миРНК. Однако максимальный показатель составил не более 3,75lg.

Насколько статистически достоверными были показатели в отношении вирусов гриппа А(Н5N1) и А(Н7N9)?

2. Почему все эксперименты проводили при введении микрокапсул с комбинацией миРНК за 24 часа до заражения. Будет ли наблюдаться противовирусное действие композиции инкапсулированных миРНК, при их введении за больший период времени до инфицирования клеток (профилактический), одновременно и после инфицирования (лечебный)?
3. Насколько ингибирование вирусной репродукции миРНК будет эффективным в условиях дрейфовой изменчивости эпидемических штаммов вирусов гриппа?

Сделанные замечания не снижают научной и практической ценности диссертационной работы и не влияют на общую положительную оценку полученных результатов.

### **Заключение.**

Диссертационная работа Бродской Александры Валерьевны на тему «Разработка противовирусной композиции малых интерферирующих РНК для ингибирования репродукции вируса гриппа А», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология, является научно-квалификационным исследованием, результатом которого явилось решение актуальной народно-хозяйственной проблемы – разработка комбинации малых интерферирующих РНК и системы их доставки в клетки, что позволит использовать полученные данные при конструировании новых лекарственных препаратов для профилактики и лечения гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа А.

По своей актуальности, научной новизне и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа отвечает требованиям, п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного

Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Автор представленной диссертационной работы Бродская А.В. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.02 – вирусология.

Отзыв обсужден и одобрен на научной конференции Отдела экологии вирусов с научно-практическим центром по экологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», подразделение Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России 17.05.2018г. (Протокол № 3).

Заведующая лабораторией этиологии и эпидемиологии гриппа  
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России  
д.м.н. Бурцева Елена Ивановна  
Москва 123098 ул. Гамалеи д.18  
тел.8 499 190 30 46, e-mail: [elena-burtseva@yandex.ru](mailto:elena-burtseva@yandex.ru)



Подпись Бурцевой Е.И. заверяю.

Ученый секретарь ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России  
(123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18 Тел. 193-71-71, e-mail: [info@riem.ru](mailto:info@riem.ru))

к.б.н. Кожевникова Л.К.

