

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01

на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 02 марта 2016 г. № 1

О присуждении **Кузьмичу Алексею Ивановичу**, гражданину РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Использование натрий-йодидного симпортера (NIS) для детекции доставки генотерапевтических агентов в опухолевые клетки» по специальности 03.01.03 - молекулярная биология принята к защите 16 декабря 2015 г., протокол № 21, диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10), действующего на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г.

Соискатель Кузьмич Алексей Иванович, 1987 года рождения, в 2009 году окончил Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова по специальности «биохимия». В 2009 году поступил в очную аспирантуру Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) и в 2012 году ее окончил. В настоящее время работает инженером лаборатории структуры и функций генов человека в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Диссертация выполнена в лаборатории структуры и функций генов человека Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель - доктор химических наук, академик РАН **Свердлов**

**Евгений Давидович**, руководитель лаборатории структуры и функций генов человека Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

1. **Янковский Николай Казимирович**, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук;
2. **Эльдаров Михаил Анатольевич**, кандидат биологических наук, руководитель Группы генетической инженерии грибов Института биоинженерии Федерального государственного учреждения «Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки **Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта** Российской академии наук, г. Москва – в своем положительном заключении (заключение составил Прасолов Владимир Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией клеточных основ злокачественных заболеваний, утвердил Карпов Вадим Львович, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора ИМБ РАН по науке) указала, что диссертация является завершённой научно-исследовательской работой, которая по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и новизне, безусловно, удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертация соответствует критериям, установленным “Положением о присуждении ученых степеней” (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842) для ученой степени кандидата наук, а ее автор, Кузьмич Алексей Иванович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - “Молекулярная биология”.

Соискатель имеет 14 опубликованных работ, из них по теме диссертации

опубликовано 9 работ, в том числе 3 научных статьи объемом 3 печатных листа, из которых две опубликованы в российских рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК, и одна в зарубежном научном журнале, входящем в научную базу цитирования Web of Science.

Научные работы по теме диссертации, в которые автор внес основной или существенный вклад:

1. **Кузьмич А.И.** Натрий-йодидный симпортер как репортерный белок в разработке генотерапевтических препаратов.//Медицинский академический журнал, 2012, Т.12 (3), стр. 74-75

2. Durymanov M.O., Slastnikova T.A., **Kuzmich A.I.**, Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Egorov S.Y., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Microdistribution of MC1R-targeted polyplexes in murine melanoma tumor tissue.//Biomaterials, 2013, V.34 (38), P.10209-10216

3. **Кузьмич А.И.**, Копанцев Е.П., Виноградова Т.В., Сverdlov E.D. Сравнительный анализ активности различных промоторов при экспрессии гена *NIS* в клетках меланомного происхождения.//Молекулярная биология, 2014, Т. 48 (1), стр. 142-152

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1.1. В разделе «Материалы и методы» отсутствует перечень использованного оборудования; 1.2. При описании результатов экспериментов *in vivo* на рисунках 17 и 18 распределение радиоизотопа в организме животных представлено с помощью теплокарты. При этом на данных рисунках не приведена шкала цветов; 1.3. В тексте встречаются неудачные неологизмы, например, «лигандированные полиплексы». Правильнее, на мой взгляд, было бы написать «полиплексы, содержащие лиганд».

2. Отзыв официального оппонента д.б.н., профессора, чл.-корр. РАН Янковского Николая Казимировича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: 2.1. Промоторную активность изучали с помощью измерения свечения люциферазы, при этом между изученными промоторами были выявлены значительные различия. В то же время активность симпортера под контролем тех же промоторов различалась слабо. С чем связано данное несоответствие? 2.2. В экспериментах *in vivo* накопление радиоизотопа наблюдалось не только в опухоли,

но и в других органах мышей. С чем это связано и каковы следствия такой активности? 2.3. В работе мало информации о поликатионе ПЭГ-ПЭИ, который использовался в качестве средства доставки плазмидной ДНК *in vivo*. Возможно, стоило более подробно рассмотреть его свойства и модификации.

3. Отзыв официального оппонента к.б.н. Эльдарова Михаила Анатольевича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: 3.1. Описание процедур клонирования генов NIS, лактопероксидазы и пр., конструирования векторов на их основе целесообразно было бы перенести в раздел «Материалы и методы», поскольку эти подробности затрудняют восприятие основного экспериментального материала работы в разделе «Результаты и обсуждение». 3.2. В работах по органификации йодида, рассмотренных в литературном обзоре, использовалась тиреопероксидаза, которая осуществляет данный процесс в норме в щитовидной железе. Из текста диссертации неясно, почему в качестве йодид-окисляющего фермента была выбрана лактопероксидаза? 3.3. Большинство изученных промоторов названы специфичными, при этом в диссертации нет экспериментальных данных, подтверждающих их опухолевую или тканевую специфичность. 3.4. При изучении распределения изотопа в мышцах с опухолями, стабильно-экспрессирующими симпортер, на 3D-проекциях йод обнаруживался в том числе в мочевом пузыре (рис. 17А в диссертации). В аналогичном эксперименте, но при введении полиплексов, изотоп на 3D проекциях в мочевом пузыре не обнаруживался (рисунок 18Б в диссертации). С чем связано такое различие? 3.5. В опытах *in vitro* автор показал, что плазмиды с геном NIS под контролем промоторов рCMV и 3ET-рMIA обеспечивают сходный высокий уровень транзientной экспрессии NIS *in vitro*. Непонятно, почему автор ограничился использованием только одной «конститутивной» конструкции *in vivo* и не стал использовать вариант с опухолеспецифичным промотором?

4. Отзыв на автореферат от Стародубовой Елизаветы Сергеевны, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории регуляции внутриклеточного протеолиза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта

Российской академии наук. Отзыв положительный, критических замечаний нет.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их достижениями в области молекулярной биологии и биотехнологии, а также наличием большого количества публикаций в высокоцитируемых российских и зарубежных журналах по теме диссертации соискателя. Их высокая квалификация позволяет объективно оценить научное и практическое значение настоящей диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработана репортерная система, позволяющая неинвазивно отслеживать процесс адресной доставки генов в ткань опухоли. В ходе работы впервые установлена нелинейная зависимость репортерного сигнала от активности используемого промотора. Используя разработанную репортерную систему, соискателю удалось продемонстрировать повышенную эффективность доставки генов в опухоль полиплексами, содержащими лиганд, специфичный к поверхности меланомных клеток. Предложена оригинальная система внутриклеточной органификации йодида, потенциально способная увеличить время удержания радиоизотопа в клетках.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что диссертация Кузьмича А.И. раскрывает фундаментальные ограничения репортерной системы на основе NIS, связанные с зависимостью от эффективности используемого промотора и ограниченным временем удержания захваченного йодида, а также предлагает потенциальные пути преодоления этих ограничений;

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что: разработана система для рационального сравнения эффективности различных средств доставки терапевтических генов в опухоли млекопитающих. Результаты диссертации в дальнейшем могут найти практическое применение в области разработки и клинических испытаний новых генотерапевтических и клеточных препаратов.

Применительно к проблематике диссертации результативно (то есть с получением новых данных) использованы различные методы современной

молекулярной биологии, а также современные методы визуализации целевых клеток в организме модельных животных, такие как однофотонная эмиссионная компьютерная томография.

Оценка достоверности результатов основывается на том, что они получены с использованием сертифицированного оборудования и материалов; доказана воспроизводимость результатов исследования; идеи и концепции, изложенные в диссертации, базируются на современных представлениях биологической науки.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в выборе направления исследований, разработке и выборе экспериментальных подходов, обработке и анализе полученных экспериментальных данных. Основные экспериментальные данные получены соискателем лично за исключением данных ОФЭКТ/КТ томографии, полученных сотрудниками лаборатории проф. А.С. Соболева (ИБГ РАН и биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова). Подготовка основных публикаций по выполненной работе проведена при непосредственном участии автора.

На заседании 2 марта 2016 г. диссертационный совет принял решение присудить Кузьмичу Алексею Ивановичу ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 7 докторов наук (по специальности 03.01.03 – молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель диссертационного совета  
Академик РАН

Ученый секретарь диссертационного совета  
Д.ф.-м.н.



Иванов В. Т.

Олейников В. А.