



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@eimb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

02. февраль № 12312 - 2171
г.б.16г.
На № _____ от _____



Утверждаю
Зам. директора ИМБ РАН
Д.б.н., проф. В.И. Карпов.

Отзыв ведущей организации

о диссертационной работе Алексея Ивановича Кузьмича
«Использование натрий-йодидного симпортера (NIS) для детекции доставки
генотерапевтических агентов в опухолевые клетки»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности молекулярная биология - 03.01.03.

В настоящее время смертность населения Земли от онкологических заболеваний занимает второе место после сердечно-сосудистых заболеваний. Ежегодно в России около 190 тыс. человек впервые признаются инвалидами по онкологическому заболеванию (30% - инвалиды I группы, 55% – инвалиды II группы, 15% – инвалиды III группы).

Несмотря на усилия исследователей многих ведущих научных центров мира, к сожалению, проблема эффективной диагностики и лечения или, как принято говорить теперь, тераностики далека от разрешения.

Определенный прогресс в этом направлении связан с развитием биомедицины, в частности, ее раздела - генной терапии. Разработка вирусных и невирусных экспрессирующих векторов, способов адресной доставки и тканеспецифической экспрессии, включая опухолеспецифическую, являются актуальными направлениями современной онкологии, с которыми связаны надежды на создание новых эффективных подходов борьбы со злокачественными заболеваниями.

Многие из разрабатываемых в настоящее время методов тераностики основаны на

использовании репортерных белков, которые широко используются в биологических исследованиях в качестве молекулярных инструментов, позволяющих проводить неинвазивную визуализацию биологических структур и процессов, происходящих как в отдельных клетках, так и в масштабах целого организма. Одна из важнейших точек приложения таких белков – отслеживание доставки терапевтических генов в заданные ткани и органы, что необходимо в ходе испытаний так называемых генопрепаратов. Созданная на сегодняшний день панель репортерных белков и их зондов решила многие актуальные задачи неинвазивной визуализации в лабораторных условиях, но в то же время для изучения биораспределения генопрепаратов в организме человека необходима дальнейшая разработка и оптимизация репортерных систем.

Диссертационная работа Алексея Ивановича Кузьмича «Использование натрий-йодидного симпортера (NIS) для детекции доставки генотерапевтических агентов в опухолевые клетки» посвящена разработке репортерной системы на основе натрий-йодидного симпортера - трансмембранного белка NIS, осуществляющего перенос йодид-ионов из внеклеточной среды в цитоплазму клеток. А.И. Кузьмичу удалось применить созданную им репортерную систему для изучения эффективности доставки генетического материала как *in vitro* в перевиваемые клетки человека и мыши, так и *in vivo* в клетки привитых мышам опухолей меланомы. При этом была достигнута более высокая эффективность доставки рекомбинантных ДНК-конструкций, осуществляемой поликатионным носителем, содержащим лиганд к рецептору, представленному на поверхности меланомных клеток, по сравнению с контрольным носителем без соответствующего лиганда.

Существенные результаты были получены при сравнении эффективности промоторов (как природных, так и искусственно созданных, химерных), различающихся силой и специфичностью в опухолевых клетках.

Диссертантом также проведено исследование активности репортерного белка, образующегося в меланомных клетках при доставке *in vitro* экспрессионных конструкций, содержащих репортерный ген под контролем этих промоторов.

Научная новизна, актуальность и оригинальность работы не вызывает сомнений.

Диссертация построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и выводов, списка сокращений и списка литературы. Материал диссертации изложен на 101 странице и хорошо иллюстрирован (18 рисунков и 3 таблицы).

Во введении обоснована актуальность исследования, сформулированы его цель и основные задачи, а также отражена научная новизна и практическая значимость данной работы.

Обзор литературы содержит несколько разделов. В первых трех разделах обсуждается необходимость использования методов молекулярной визуализации в рамках

развития генной терапии, кратко рассматривается спектр современных методов визуализации *in vivo* и более детально обсуждаются системы мониторинга, основанные на использовании радиоактивных зондов. В четвертом разделе обсуждаются непосредственно связанные с темой работы данные литературы: биология натрий-йодидного симпортера и его использование в качестве репортерного или терапевтического гена. Обзор хорошо структурирован и обобщает результаты около 100 статей.

Раздел «Материалы и методы» подробно описывает ход экспериментов, выполненных диссертантом. Он содержит детальное описание материалов и методов исследования. Описания экспериментов достаточно полны для их воспроизведения.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из нескольких частей. В первой части автор достаточно подробно описывает пройденный экспериментальный путь от выбора подходящего источника гена, кодирующего натрий-йодидный симпортер, до получения репортерной системы, работающей в меланомных клетках.

Следующая часть работы посвящена вопросу чувствительности созданной системы к различиям в активности промоторов, используемых в экспрессионных конструкциях с репортерным геном. В данном случае были изучены промоторы трех типов, различающиеся по специфичности и активности в опухолевых клетках: сильные неселективные, тканеспецифичные и опухолеспецифичные промоторы. На клеточной модели меланомы автор убедительно демонстрирует, что, несмотря на значительную разницу в активности промоторов разных типов, полученная репортерная система может обеспечивать высокий уровень детектируемого сигнала (поглощение радиоактивного йодида) при использовании достаточно активных неспецифических и тканеспецифических промоторов. В то же время более низкой активности промоторов с широкой опухолевой специфичностью было недостаточно для надежной детекции экспрессируемого симпортера.

Значительная часть работы касается времени удержания радиоизотопа, захваченного клетками, экспрессирующими симпортер. Автором было показано, что созданная репортерная система при трансфекции клеток *in vitro* может обеспечивать высокий уровень захвата радиоактивного йодида клетками, однако захваченный изотоп быстро (в течение десятков минут) вымывается из них. Далее в работе описывается попытка увеличения времени удержания йодида за счет его внутриклеточного окисления лактопероксидазой. Заслуживает внимания разработанный А.И. Кузьмичом способ одновременной экспрессии двух генов, кодирующих натрий-йодидный симпортер и лактопероксидазу, за счет использования в генетической конструкции вирусной последовательности 2A. К сожалению, несмотря на достигнутую одновременную продукцию обоих белков в трансфицированных клетках, увеличение времени удержания йодида не наблюдалось.

В последней части диссертации показана возможность использования созданной системы для неинвазивной визуализации *in vivo*. Диссертант представляет результаты совместной с коллегами из Института биологии гена РАН работы по визуализации в организме мыши меланомных клеток, экспрессирующих репортерный белок. Существенно, что в условиях *in vivo* удалось наблюдать не только меланомные клетки, заранее стабильно трансфицированные репортерным геном, но также и опухоли меланомы после системного введения комплексов плазмидной ДНК с полимерным носителем. Более того, чувствительности созданной системы было достаточно, чтобы выявить различия в эффективности между комплексами, содержащими и не содержащими адресный лиганд.

В целом, диссертационная работа А.И. Кузьмича выполнена на высоком экспериментальном уровне, результаты работы не вызывают сомнений и являются приоритетными. Диссертация написана хорошим языком и позволяет заинтересованному читателю быстро войти в курс дела. Все части работы хорошо и полно изложены. Рисунки достаточно просты в понимании и хорошо иллюстрируют текст.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Результаты работы были опубликованы в трех рецензируемых научных журналах, доложены на российских и международных конференциях.

Тем не менее, несмотря на несомненные достоинства работы, она не лишена небольших недочетов:

1. В разделе «Материалы и методы» отсутствует перечень использованного оборудования.
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.
3. В тексте встречаются неудачные неологизмы, например, «лигандированные полиплексы». Правильнее, на мой взгляд, было бы написать «полиплексы, содержащие лиганд».

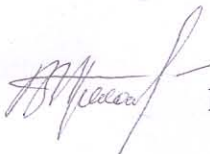
Названные недочеты не умаляют достоинств работы и не снижают общего положительного впечатления от нее.

Представленная диссертация является завершенной научно-исследовательской работой, которая по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и новизне, безусловно, удовлетворяет требованиям ВАК Российской Федерации, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертация соответствует п. 9 «Положения 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».

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний ИМБ РАН, протокол № 14 от 2 февраля 2016 года.

Заведующий лабораторией
клеточных основ развития
злокачественных заболеваний
Федерального государственного
Бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии
им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук
д.б.н., проф.

специальность - молекулярная биология



Прасолов В.С.

Контактная информация:

Почтовый адрес: ГСП-1, 119991, г.Москва, ул. Вавилова, д.32, ИМБ РАН

E-mail: isinfo@eimb.ru