

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКОВ М.М.ШЕМЯКИНА И Ю.А.ОВЧИННИКОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИБХ РАН)

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН
2 марта 2016 года

Защита диссертации

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Кузьмичом Алексеем Ивановичем

«Использование натрий-йодидного симпортера (NIS) для детекции
доставки генотерапевтических агентов в опухолевые клетки»

по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Москва

2016 г.

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН

2 марта 2016 года

Председатель диссертационного совета

Академик РАН

В.Т.Иванов

Учёный секретарь диссертационного совета

доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов наук по профилю диссертации – 7. Кворум имеется.

1.	Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2.	Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
3.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
4.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
5.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(03.01.06)
6.	Член-корр. РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
7.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
8.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
9.	Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
10.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
11.	Академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
12.	Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
13.	Д.х.н.	Молотковский Юлиан Георгиевич	(02.00.10)
14.	Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
15.	Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
16.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
17.	Академик РАН	Свердлов Евгений Давидович	(03.01.03)
18.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
19.	Д.х.н.	Формановский Андрей Альфредович	(02.00.10)
20.	Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
21.	Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)

Вадим Тихонович Иванов:

– Доброе утро! Мне докладывают мои коллеги, что, несмотря на транспортные трудности, кворум есть. И поэтому я предлагаю приступить к делу. У нас сегодня более менее традиционная повестка дня, даже не более менее, а следующая повестка дня – две защиты, две кандидатские защиты. Нет возражений, изменений, дополнений к повестке дня? Не вижу. Тогда, Владимир Александрович, доложите нам ситуацию.

Владимир Александрович Олейников:

– Первая защита – это Кузьмич Алексей Иванович защищается.

(Зачитывает документы, содержащиеся в личном деле соискателя. Отмечается, что материалы личного дела и документы предварительной экспертизы соответствуют требованиям Положения ВАК).

Вадим Тихонович Иванов:

– Нет вопросов? На всякий случай спрашиваю, обычно не бывает. Нет. Тогда слово диссертанту. Алексей Иванович, 20 минут Вам для доклада.

Алексей Иванович Кузьмич:

(Излагает основные положения диссертационной работы).

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо за доклад. Переходим к вопросам. Кто хотел бы задать вопрос? Прошу, а потом сзади.

Лев Иванович Патрушев:

– Скажите, пожалуйста, а почему Вы отказались от специфических промоторов в опытах *in vivo*? Казалось бы, специфичность можно было бы повысить еще, но Вы использовали сильный неспецифический промотор.

Алексей Иванович Кузьмич:

– Вопрос понятен. Нам было интересно: использованная система доставки при системном введении внутривенно, обеспечивает ли она трансфекцию помимо опухоли каких-то других органов? Если бы мы использовали меланомоспецифический промотор, то мы не смогли бы оценить побочную доставку гена. Поэтому мы использовали сильный вирусный промотор, чтобы оценить все возможные мишени данного полиплекса.

Лев Иванович Патрушев:

– Нет, но можно было бы использовать и то и то.

Алексей Иванович Кузьмич:

– Да. Можно было бы провести еще один эксперимент, но, к сожалению...

Лев Иванович Патрушев:

– К сожалению, времени не хватило?

Алексей Иванович Кузьмич:

– Да. К сожалению, времени не хватило.

Вадим Тихонович Иванов:

– Так, последний ряд.

Илья Владимирович Скачков (из зала):

– Спасибо за замечательную работу, с удовольствием прочитал автореферат. У меня такой вопрос - планируете ли вы использовать эту систему только для работы на животных или для человека она тоже может быть использована? Это первый вопрос. Второй вопрос...

Вадим Тихонович Иванов:

– Давайте по очереди! Сначала первый вопрос он ответит, а потом второй вопрос.

Алексей Иванович Кузьмич:

– По поводу использования в экспериментах на людях я могу сказать только о теоретической возможности. В принципе данная система практически полностью годится для проведения клинических испытаний, потому что методы и изотопы, позволяющие детектировать активность данного белка в организме как животных, так и человека, они уже сегодня используются в медицине. То есть данная система абсолютно применима для испытаний на людях за единственным исключением, что мы использовали натрий-йодидный симпортер крысиного происхождения. Конечно, для испытаний на людях нужно будет получить ген человеческого происхождения.

Илья Владимирович Скачков (из зала):

– И второй вопрос. В связи с этим, не кажется ли вам то, что ваш недостаток (заметили то, что у вас быстро вымывается йодид) является достоинством, потому что время между СПЕКТ-сканированием и введением препарата составляет где-то как раз в пределах 30 минут? То есть фактически как раз в целях диагностики, если не брать в расчет терапию, для целей диагностики как раз плюсом является то, что препарат быстро выводится.

Алексей Иванович Кузьмич:

– Да, вопрос понятен. Да действительно, после получения результатов в условиях *in vitro*, когда йодид вымывался буквально в течение... большая часть терялась в первые 10 минут, мы, конечно, немного расстроились, потому что, если бы это наблюдалось *in vivo*, то это сильно бы затрудняло работу при проведении испытаний *in vivo*. Однако то, что мы наблюдали далее в условиях *in vivo*, а это несколько часов удержания радиопрепарата, этого вполне достаточно для того, чтобы проводить мониторинг активности в диагностических целях. При этом именно более длительное удержание необходимо для терапевтического применения данной системы,

потому что, вообще говоря, натрий-йодидный симпортер для лечения щитовидной железы используется и как терапевтический ген. Я имею в виду экспрессию эндогенного гена. Соответственно, если мы хотим использовать данный белок для радиотерапии опухолей, нужно будет существенно увеличить время удержания. Но для диагностической задачи он полностью подходит. И это даже действительно преимущество.

Вадим Тихонович Иванов:

– Так, еще были вопросы. Да, прошу.

Дарья Сергеевна Спасская (из зала):

– Скажите, а почему вы использовали разные изотопы йода в экспериментах *in vivo* и *in vitro*?

Алексей Иванович Кузьмич:

– Да, мы использовали ^{125}I и ^{123}I . Вообще, ^{125}I отличается довольно большим периодом полураспада, около 60 дней, но при этом энергия его излучения достаточно низка. Он удобен для работы, то есть относительно безопасен и нет нужды постоянно обновлять пул радиоактивного препарата, при экспериментах *in vitro*. Однако, для экспериментов *in vivo* он не очень годится, в первую очередь из-за низкой энергии излучения. ^{123}I обладает более высокой энергией излучения и, соответственно, его просто легче детектировать при проведении однофотонной эмиссионной компьютерной томографии. Поэтому мы использовали разные изотопы.

Вадим Тихонович Иванов:

– Да, прошу. Долгих.

Дмитрий Александрович Долгих:

– Скажите, пожалуйста, у меня вопрос, касающийся промоторов. У вас были какие-то контрольные эксперименты, показывающие степень специфичности их? Например, те же меланомные на немеланомных линиях?

Алексей Иванович Кузьмич:

– В рамках моей работы такие эксперименты не проводились, то есть мы использовали промоторы, которые ранее были созданы в нашей лаборатории или созданы нашими коллегами, но они исследовались в нашей лаборатории другими людьми. Такие эксперименты проводились, путем аналогичного эксперимента с определением двойной люциферазной активности. И эти эксперименты показывают, что действительно, скажем, меланомоспецифический промотор обладает высокой активностью в клетках именно меланомного происхождения, тогда как в опухолевых клетках другого генеза он, как правило, был неактивен. Наши опухолеспецифические промоторы также исследовались, активность данных промоторов сравнивалась в клетках нормального происхождения, например в фибробластах тканей, и в клетках различного опухолевого происхождения, это достаточно

широкий спектр линий. И действительно, мы наблюдали значительно более высокую их активность в клетках опухолевого происхождения. Но я в своей работе данную активность не доказывал.

Дмитрий Александрович Долгих:

– Но эта разница в порядки?

Алексей Иванович Кузьмич:

– Эта разница, скажем, для меланомоспецифического промотора разница, наверное, порядок-два где-то. Для опухолеспецифического – это порядок или чуть меньше.

Вадим Тихонович Иванов:

– Что такое полиплекс?

Алексей Иванович Кузьмич:

– Полиплекс – это фактически комплекс поликатионного носителя, в нашем случае это был блок-сополимер полиэтиленгликоля и полиэтиленimina, и плазмидной ДНК. Данные комплексы имеют нанометровый размер, порядка 70-150 нм. И это просто устоявшееся название таких средств доставки.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Вопросы еще? Ефремов.

Роман Гербертович Ефремов:

– У меня такой общий вопрос. Скажите, пожалуйста, как ваши коллеги в мире решают проблему такого неинвазивного контроля доставки генетического материала? Все ли работают с радиоактивными изотопами? Потому что может быть для диагностики и лечения это не самый оптимальный вариант. И чем ваш метод лучше или хуже используемых на практике?

Алексей Иванович Кузьмич:

– Понятно. Спасибо за вопрос. Да действительно, я упоминал в докладе, что вообще репортерных систем, позволяющих решать задачи подобного рода, существует множество. Но я бы выделил три основные группы. Это оптические методы, основанные на использовании репортерных белков, активность которых регистрируется по флуоресценции или по люминесценции при окислении люцифериннов или чего-то подобного. Также существуют методы, основанные на регистрации ядерного магнитного резонанса, и радионуклидные методы, основанные на определении распределения изучаемого белка по его взаимодействию с радиоактивными зондами. Радионуклидных систем тоже много. Я бы хотел сказать, чем хороши именно радионуклидные методы, скажем, по сравнению с оптическими репортерными системами. Во-первых, оптические репортерные системы все таки ограничены глубиной проникновения излучения, видимого излучения света, и, скажем, для проведения экспериментов на животных эти системы идеальны. То есть они очень удобны, нет работы с

радиоактивными материалами, достаточно высокое разрешение. Но если мы переходим на крупных животных или на человека, то пока данные методы находятся в стадии разработки. При этом радионуклидные методы, фактически это однофотонная эмиссионная компьютерная томография, позитронная эмиссионная томография, позволяют использовать животных крупного размера и человека и уже используются в медицине. Кроме того радиопрепараты, радиозонды, уже сегодня достаточно широкий спектр данных препаратов существует в клинике. В этом есть определенные преимущества с точки зрения трансляции данной системы в клинику. Но я хочу напомнить, что для проведения лабораторных испытаний на небольших животных, пожалуй, оптические системы более удобны.

Вадим Тихонович Иванов:

– Татьяна Владимировна.

Татьяна Владимировна Овчинникова:

– Замечательная работа, очень четкий доклад. А вопрос такой – как вы можете объяснить наблюдаемый факт накопления радиоактивного йодида в желудке при системном введении?

Алексей Иванович Кузьмич:

– Вообще, натрий-йодидный симпортер у человека экспрессируется в основном в щитовидной железе, то есть при проведении сцинтиграфии или однофотонной эмиссионной томографии накопление радиойодида или пертехнетата обнаруживается в основном в щитовидной железе. Это эндогенная экспрессия. Однако у грызунов также наблюдается значимая эндогенная экспрессия и в желудке. Соответственно, при введении радиойодида мы наблюдали накопление, помимо опухоли трансфицированной, накопление и в щитовидной железе и в желудке. Конечно, это несколько ограничивает применимость нашей системы. То есть мы не можем, скажем, отслеживать, произошла ли нецелевая доставка гена в желудок или в щитовидную железу. Но зная то, что радиопрепарат там точно будет накапливаться, мы можем не обращать на это внимание. Это неизбежное свойство данной системы.

Вадим Тихонович Иванов:

– Есть ли еще вопросы? Похоже, они иссякли. Можете отдохнуть немножко. Дальше у нас по процедуре отзыв ведущей организации.

Владимир Александрович Олейников:

– Ведущая организация – это Институт молекулярной биологии имени Энгельгардта. Отзыв полностью положительный.

(Зачитывает отзыв, отзыв прилагается)

В отзыве ведущей организации приведены следующие замечания:

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 достоинства работы, не снижают общего положительного впечатления о ней. Представленная диссертация является завершенной научно-исследовательской работой, которая по поставленным

задачам, уровню их решения, актуальности и новизне, безусловно, удовлетворяет требованиям ВАК. Соответственно, диссертация соответствует п. 9 “Положения о присуждении ученых степеней”, а Кузьмич Алексей Иванович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - “Молекулярная биология”.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании семинара лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний ИМБ РАН и, соответственно, подписан заведующим лабораторией клеточных основ развития злокачественных заболеваний этого Института доктором биологических наук профессором Прасоловым. Соответственно, утвержден отзыв заместителем директора ИМБ РАН профессором Карповым.

Замечания три было.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Алексей Иванович, может быть сделаем так – зафиксируем, что Вы согласны с замечаниями и двинемся дальше? Или у Вас есть желание поспорить?

Алексей Иванович Кузьмич:

– Я согласен со всеми замечаниями.

Вадим Тихонович Иванов:

– Зафиксировали. Спасибо. Я не вижу Евгения Давидовича, руководителя научного.

Владимир Александрович Олейников:

– Он позвонил, сказал, что он едет, будет через 10 минут.

Вадим Тихонович Иванов:

– Хорошо. Тогда... Я не знаю, будет ли это криминальным нарушением, если мы потом заслушаем мнение научного руководителя, когда он появится. Давайте сделаем таким образом. А пока у нас отзывы на автореферат надо посмотреть.

Владимир Александрович Олейников:

– Значит, на автореферат в совет поступил один отзыв. Отзыв полностью положительный. Тут пишется: «Работа Кузьмича выполнена на высоком уровне с использованием современного оборудования, современных методов молекулярной биологии. Цель и задачи, поставленные в

работе, достигнуты, достоверность полученных результатов сомнений не вызывает. Результаты работы обладают несомненной новизной и имеют как научную, так и практическую ценность». Подписано – старший научный сотрудник лаборатории регуляции внутриклеточного протеолиза, кандидат биологических наук Стародубова. Без замечаний.

Вадим Тихонович Иванов:

– Если нет замечаний, то это примем к сведению. Двигаемся дальше. Далее у нас отзывы официальных оппонентов. Член-корреспондент Янковский Николай Казимирович.

Николай Казимирович Янковский:

(Отзыв положительный, отзыв прилагается)

– Глубокоуважаемый председатель, глубокоуважаемые члены Ученого совета, коллеги! Я оппонирую диссертации примерно лет 40 и сложность их, естественно, растет. Все большее количество разных наук объединяется в одном предмете и эта в этом отношении рекордная, к моей печали, диссертация по ее комплексности. И основной вопрос, который был, что когда диссертация написана очень хорошо, понятно и автореферат... Как-то я оппонировал одного финна и сказал, в качестве впечатлившей меня особенности, что написано очень хорошим русским языком. При этом руководитель диссертации печально вздохнул. И я, честно сказать, послушав доклад, понял, что человек действительно знает, почему работа была так сделана, умеет ее сделать и он понимает те ограничения, которые имеются в выводах, которые он на основе своей работы сделал. Вообще, действительно значительная часть этой работы мне понятна, потому что, когда начиналась геновая инженерия вся эта, все эти ферменты, молекулы ДНК векторные, способы их получения, трансфекции, экспрессии – все это было. Как-то это последние десять лет какие-то вопросы основные для меня – это исследование информационного содержания полиморфизмов в генетически гетерогенных популяциях человека в условиях брачной ассортативности, обусловленной этнической специфичностью. И поэтому это, конечно, достаточно далеко от темы диссертации сегодняшней, но не исключает того, что заметная ее часть мне известна головой и руками. А вот то, что сделано в отношении клеточных технологий, - это хоть и не совсем моя специальность, но мне понятна четкость изложения, которая убеждает, что сделанные выводы правильны. Работа состоит из нескольких частей. В начале был выбран... Да, вообще зачем она нужна? Это надо с самого начала сказать, что оценка того, может ли генотерапевтический препарат достигнуть в данных условиях мишени и сработать, - это нужно изучать на моделях прежде всего. И такая модель разрабатывается. Нужно уяснить, что препарат достигает клеток, нужных клеток по типу ткани или органа, достигает их и только их, а потом, когда он их достиг, нужно знать, поскольку это генотерапевтический препарат – он должен экспрессировать соответствующий белок внутри нужной клетки, и это определяется тем, что регуляторные элементы, которые обеспечивает

экспрессию целевого белка доставляемого, они там работают достаточно эффективно и специфично. Это разнородные требования к разным этапам работы, но все они должны быть собраны вместе с тем, чтобы работа и как модель была продемонстрирована эффективной и в дальнейшем как практически полезный метод был бы использован. Я очень был впечатлен тем, как на каждом этапе тщательно выбирались инструменты исследования. Вот первый этап – это натрий-йодидный симпортер был выбран, ген соответствующий, из ряда объектов. Была выбрана крыса, ген крысы, хотя экспрессия шла в основном в мышинных моделях с также проведенными исследованиями и на клетках человека. То есть в каждом случае и постановка задачи понятна, и она четко выполнена, и сделан вывод, который позволяет делать следующий шаг на каждом этапе своей засады. Соответственно, был выбран этот ген. После этого надо было выбрать те промоторы, которые работают там и только там, где интересно автору. В данном случае это были не просто опухолевые клетки, но конкретно меланома. На этом этапе, надо сказать, что здесь принципиальная засада философская, которая чаще всего пропагандируется совершенно справедливо Евгением Давидовичем, то, что двух опухолей одинаковых не бывает. И если вы уяснили, что в выбранной вами некоторой модельной системе регуляторные элементы успешно работают, - это, вообще говоря, не обязательно означает, что в конечной мишени, которой является индивид, у которого данная опухоль всегда индивидуальная и не могущая совпасть с опухолью другого человека никогда. Вот так, во всех деталях. То есть нельзя сказать, что это совершенно точно сработает. Что не исключает того, что необходимо оценить вообще, что система работает адекватно. А будет ли она работать конкретно в данном индивиде – это вопрос отдельный, с отдельной сложностью. Но из того, что было проверено, когда были взяты и сильные промоторы, чтобы точно там чего-то сложилось, экспрессия, и специфические промоторы, которые могут быть специфичными, но в другой линии или в другом... Ведь проверялось все это: ген крысы, регуляторные элементы и такие и сякие, потому что они были скомбинированы из ряда объектов, а экспрессия там в другом виде. То есть здесь, на самом деле, есть некоторая неопределенность исходно заложенная, что неясно было, что это получится, но это надо было исследовать. И для того, чтобы получить разумный результат, обоснованный для дальнейшего движения, нужно было поставить огромное количество контролей, и каждый этап ими сопровождался как при выборе гена, так и при выборе регуляторных элементов, так и при выборе клеточных линий и затем в целом организме, что было показано на мышши. Доклад был очень четкий, как и четко написан текст, поэтому я не буду пересказывать, а просто скажу, что каждый из этапов был задуман разумно, выполнен точно. Кроме того, что это дошло до уровня целого организма, что не так давно в общем-то является частью комплексной работы, там были и очень интересные химические придумки, что, естественно, для Евгения Давидовича как химика по образованию

естественно, но я всякий раз читаю, начиная с Лукьянова и до нынешней работы, впечатляюсь тем, что традиционно химическое мышление приложено к работам биологического профиля очень удачно, очень полезно. Не буду дальше перечислять все детали, просто скажу, что каждый из этапов работы был необходим. Не каждый дошел до того, что был получен практически полезный результат, но этого и быть не могло, но эти этапы необходимо было пройти. И общий итог работы, что подход, такой как был принят. Тут был задан вопрос, почему вы радиоактивность наблюдали? Действительно других проникающих сигналов как-то и непонятно откуда взять, а те, которые в видимой части света в данных репортерных системах используются, они хороши, конечно, но ведь не видать ничего. Это когда они на клеточке отдельной – это хорошо, а когда в организме – так и не видно. Поэтому то, что были использованы радиоактивные изотопы, которые потом визуализируются, компьютерная томография используется, - это вполне естественно. И для модели это оптимально. Кроме того здесь была задумка параллельная. Работа содержала две таких огромных цели: одна – это выбрать метод исследования то, что есть эффективность работы созданной системы; а другая – использование в качестве терапевтического метода того, что было разработано. Потому что если, конкретно, йод радиоактивный, введенный в клетку, в достаточном количестве, локально (в силу того, что транспортер подается так, чтобы он вошел только в нужные клетки, теоретически в дальнейшем в опухолевые) он клетку может убить. То есть кроме того, что система направлена на исследование того, доходит ли агент до своей мишени и только до нее, это можно использовать и в практике, если окажется достаточная сила радиоактивности, ее достаточная локализация. Вот показано, что последнее, по крайней мере сейчас, недостижимо, а то, что метод привел к визуализации того, где находится введенный агент, и что он находится там и только там – эту цель достигнуть удалось и в этом отношении это несомненный успех работы. И еще раз впечатляет то, что раньше делалось многими людьми из разных направлений, когда складывалось в общую статью, на следующем этапе может делаться одним человеком, как это неудивительно, который способен не только понять, но и выполнить и это является основой дальнейшего развития. Я поздравляю и Алексея Ивановича, правда, его секретарь назвал Андреем Ивановичем. Вас как лучше называть?

Алексей Иванович Кузьмич:

– Алексей Иванович.

Николай Казимирович Янковский:

– Алексей Иванович, это было очень интересно и впечатляет то, что и сейчас в нашей стране при всех ее обстоятельствах можно делать работы очень высокого уровня. Там три публикации, одна из них международная. Но здесь вопрос даже не в том, какое место занимает автор, авторов много в силу комплексности работы – это неизбежно, а то, что он на самом деле

представляет себе все то, что нужно было и от партнеров получить. То есть это, несомненно, и как квалификационная работа – работа прекрасная. И я не сомневаюсь в том, что она будет поддержана ученым советом. И очередной раз впечатлен, Евгений Давидович, что Вы столь живо разнообразно и мощно продолжаете не только сами работать, но и растить людей, которые могут работать дальше как ни странно даже в этой стране сейчас.

Евгений Давидович Свердлов:

– Просто не знаю, как из этого выскочить.

Николай Казимирович Янковский:

– Да. Мне положено было в чем-то усомниться.

(1) Проверены были активности исследуемых генов, сначала на модельной системе, вместо них там стоял... не генов, а регуляторных элементов! ...ставилась люцифераза, по которой было показано, что очень различаются разные регуляторные элементы, нет сомнения, это была исходная информация. А потом оказалось, что они очень мало различаются, эти регуляторные элементы, в отношении целевого гена, который исследовался. Можно предположить, почему это может быть. Наверное, следует поделиться своими соображениями. Все, что вы сказали, совершенно разумно и в этом случае это не прозвучало достаточно четко в диссертации.

(2) И что накопление радиоизотопа наблюдалось не только в опухоли, но и в других органах мышей. Почему они там были, если никакого симпортера там нет, не вводили или он там не работает, природный? Тоже объяснение понятно, но положено что-то спросить – спрашиваю.

(3) И последнее, система полиэтиленгликоль-полиэтиленимин, которая была армирована лигандом... Вообще, для меня очень много вещей оказалось новыми, я уже закончил работать в этих областях, когда все это началось, но с большим интересом прочел в вашей работе. Почему она работает и достаточно эффективно и достаточно специфично, наверное, зависит от каких-то особенностей, которые вы применили? И здесь следовало бы об этом сказать несколько более подробно.

Я, естественно, считаю, что работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и призываю членов ученого совета ее поддержать. Спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Алексей Иванович, оппонент кое в чем усомнился. Если у вас есть желание защищаться – прошу.

Алексей Иванович Кузьмич:

– В первую очередь я бы хотел поблагодарить Николая Казимировича за столь подробный и хороший отзыв.

Вадим Тихонович Иванов:

– Это в конце, когда будете заключительное слово делать, тогда – пожалуйста.

Алексей Иванович Кузьмич:

– Отвечу на вопросы. По поводу различий в промоторной активности и симпортерной активности. Тут нужно объяснить, что промоторная активность определялась с помощью такого тоже репортерного гена, как люцифераза светлячка. Симпортер – это соответственно второй репортерный ген. Биология данных репортеров очень разная, то есть, если люцифераза – это растворимый цитоплазматический белок, обладающий ферментативной активностью, то симпортер – это трансмембранный белок и его активность зависит от многих факторов. Во-первых, ему нужно попасть на цитоплазматическую мембрану. Опять же, его активность очень зависит от градиента натрия, который есть на мембране. Поэтому, возможно, таковы причины. То есть различия в биологии, в функционировании данных белков определили то, что мы наблюдали большие различия в люциферазной активности при использовании данных промоторов, но относительно небольшие различия в симпортерной активности. Такое предположение у нас. По поводу накопления радиоизотопа в экспериментах *in vivo* не только в опухоли – данный вопрос уже поднимался. Действительно, натрий-йодидный симпортер эндогенно экспрессируется у мышей в желудке и в щитовидной железе, и действительно в данных органах мы наблюдали накопление радиопрепарата. Как я уже говорил, это может ограничивать оценку доставки генов в данные органы с помощью данной репортерной системы. То есть фактически мы должны исключать данные области из анализа распределения изотопа. И по поводу использования поликатиона полиэтиленгликоль-полиэтиленимин. Вообще, данная система была разработана не нами, она была разработана в лаборатории Александра Сергеевича Соболева. Данный конкретный носитель был подробно охарактеризован в диссертационной работе Михаила Дурыманова, который один из участников нашей совместной работы. В его работе были подробно охарактеризованы как структура, так и поведение, различные особенности данной системы, поэтому в своей диссертации я их подробно рассматривать не стал. Тем не менее, это поликатионный носитель, состоящий из ковалентно связанного полиэтиленимина и полиэтиленгликоля, при этом часть из этих носителей дополнительно содержала ковалентно привязанный пептидный лиганд к меланокортиновому рецептору. У меня все.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Перед тем, как давать слово следующему оппоненту, давайте заслушаем мнение и характеристику диссертанта научного руководителя. Евгений Давидович, мы пропустили этот пункт в повестке процедуры, но сейчас есть возможность восполнить этот пропуск.

Евгений Давидович Свердлов:

– Спасибо большое и извините все за такую задержку, но я не предполагал, что можно ехать полтора часа там, где я обычно езжу минут 20-30. И особенно печально было, что от

Ленинского проспекта до сюда я ехал почти 40 минут. А пешком идти было невозможно – там снега по колени, я бы шел еще дальше. Извините. Теперь я естественно не буду говорить о достоинствах этой работы и тем более о ее недостатках. Я хочу сказать, что мне эту работу очень жалко, потому что она задумывалась гораздо более широко и далеко, чем удалось сделать. И это не по вине диссертанта и даже не по моей вине, а просто финансовая ситуация не позволила развернуть работу в том объеме и в тех направлениях, которые изначально планировались. Хотя были программы, они были утверждены, но что? Не вам объяснять, что происходит. Мне жалко, потому что могло получиться, а может еще и получится значительно лучше. Теперь об Алексее Ивановиче. Алексей пришел в лабораторию студентом с кафедры молекулярной биологии, где я тогда еще преподавал, и он считался лучшим студентом своего курса, что никак не означало, что он будет хорошим работником, потому что одно дело хорошо сдавать экзамены, и совсем другое дело хорошо работать экспериментально. Но Алексей оказался прекрасным экспериментатором, очень энергичным, очень быстро схватывающим проблемы и с хорошим аналитическим умом, поэтому у него все контроли были выставлены всегда как надо. Появлялись самостоятельные идеи, в частности, идея с лактопероксидазой – это была его идея, хорошо проработанная со всех известных точек зрения. Это должно было работать, но в биологии часто так бывает, что оно должно работать, но почему-то не работает. Почему не понятно. Я думаю, что он давно уже работает в силу кандидата наук, он немножко ленился писать диссертацию, приходилось его сильно пихать. Работать не ленился, а вот писать ленился. У нас в лаборатории есть несколько таких индивидуумов и вот он оказался в их лагере. Но, тем не менее, работа сделана, написана, и по своим качествам, по своей подготовке, по своему потенциалу я думаю, что Алексей Иванович полностью соответствует искомой степени кандидата химических наук. Это сложившийся, энергичный, умный исследователь. Спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо, Евгений Давидович. Ну что, двинемся дальше? Слово Михаилу Анатольевичу Эльдарову, Институт Биоинженерии, который в свою очередь является частью центра фундаментальной основы биотехнологий.

Михаил Анатольевич Эльдаров:

(Отзыв положительный, отзыв прилагается)

– Добрый день, уважаемый Вадим Тихонович, члены ученого совета, коллеги. Мне кажется, что подробный отзыв ведущей организации, яркое выступление Николая Казимировича, а также уверенный доклад соискателя освобождает меня от необходимости проводить подробный анализ этой диссертации, а также не оставляет места для какой-нибудь интриги в том вопросе, заслуживает ли соискатель искомой степени. Мне кажется, что действительно это

очень содержательная, интересная, разнообразная методически работа с очень большим потенциалом и, несомненно, Алексей Иванович – это сложившийся кандидат наук. И я призываю ученый совет проголосовать за присуждение ученой степени. Теперь остановлюсь на некоторых моментах. Прежде всего, объект исследования – это натрий-йодидный симпортер. Мне кажется, он очень интересен, очень увлекателен и как диагностический и как терапевтический ген для использования в генной терапии, поскольку сочетает в себе вот эти свойства и как репортер и как ген-убийца, с помощью которого можно проводить радиойодтерапию опухолей. И, естественно, наиболее полная реализация потенциала этого гена предполагает создание как эффективных конструкций для его транзientной экспрессии, так и способов адресной доставки в системе *in vivo*. Собственно, это и является предметом работы Алексея Ивановича. Во введении он обосновывает необходимость, актуальность этих исследований и достаточно подробно в литературном обзоре он описывает свойства и характеристики этого натрий-йодидного симпортера, сравнивая его с другими репортерными системами, отмечая, конечно, существующие проблемы в генной терапии, что эффективность генной терапии не всегда оправдывает ожидания как пациентов, так и исследователей, которые применяют эти протоколы. И что необходимо повышать эффективность, для этого нужны эффективные репортерные системы. Сравняя ферментативные, флуоресцентные и радиоактивные системы, он отмечает сравнительные достоинства и недостатки каждой из них. И, конечно, выделяет радиоактивные системы, которые действительно привлекательны в силу самых разных причин как метода, и высокая чувствительность и возможность действительно глубокой визуализации *in vivo* именно внутри ткани, внутри тела экспериментального животного. Если говорить о методической части работы, она действительно очень разнообразно и, как мне кажется, украшением работы является эта однофотонная эмиссионная компьютерная томография, очень красивые картинки, которые приведены в диссертации, - это все очень наглядно и все очень привлекательно смотрится. Если говорить о работе, как о литературном произведении, то мне кажется, что здесь есть, конечно, сюжет и есть лихо закрученная интрига. В работе можно выделить пролог, основную часть и развязку. Пролог – это конечно создание необходимых конструкций, такие сначала опыты *in vitro*, подготовка к основному эксперименту, создание коллекции промоторов, их сравнение, определение опухолеспецифичных и конститутивных и сравнение работы этого репортера в системе *in vitro*. Но тут, мне кажется, очень важно наблюдение автора, что существует некий барьер в уровне продукции этого репортера в системе *in vitro*, который непонятно с чем связан. Если вы используете как сильные, так и слабые промоторы оказывается, что разницы особенной нет. Это привлекательно в том плане, что можно даже слабые промоторы использовать в системе *in vivo* для того, чтобы добиваться необходимого результата. Дальнейшие работы были связаны с

обнаруженной проблемой, что йод плохо задерживается в клетке. Можно попытаться его зафиксировать в этих тканях для того чтобы повысить эффективность как диагностики и терапии. Здесь тоже были использованы различные подходы. Была получена конструкция бицистронная с помощью 2А пептида, в качестве этого гена, который должен был зафиксировать йод в тканях, была использована лактопероксидаза. Но не очень получилось, к сожалению, хотя, конечно, Алексей Иванович старался, это видно. И он, конечно, определил активность лактопероксидазы в клетках, то есть все контроли достаточно четко были поставлены. Затем, конечно, это наиболее интересная часть – опыты *in vivo*. Были получены стабильные клетки меланомы, они были введены мышам после трансфекции, было показано, что мыши с такими привитыми опухолями эффективно накапливают введенный затем терапевтический препарат в этих клетках. Так что была доказана эффективность системы. Затем было проведено сравнение этой системы с системой адресной доставки генотерапевтического препарата уже мышам с меланомой с помощью этой однофотонной эмиссионной компьютерной томографии. И оказалось, что действительно, если вы используете эти лигандированные полиплексы со специфическим лигандом, то все это очень неплохо получается. Таким образом, ясно, что неплохой потенциал есть у этой системы, и эта система очень перспективна. Необходимы, конечно, определенные доработки, но, мне кажется, все, что мог Алексей Иванович, в этой работе он сделал. Все это очень неплохо опубликовано и доложено на различных престижных конференциях и семинарах. А теперь остановимся на некоторых недостатках. Их немного. Конечно, встречаются недочеты, неудачные обороты. Но как без этого? Более существенные замечания, мне кажется, касаются изложения раздела, посвященного собственно конструированию всех этих плазмид, клонированию генов, выделения гена натрий-йодидного симпортера, лактопероксидазы и т.д. Мне кажется, эта часть может быть излишне громоздка, и она перегружает явно раздел «Материалы и методы». Мне кажется, можно было смело перенести это в раздел «Результаты и обсуждения». Другое замечание совпадает с вопросом, который уже прозвучал. Это почему в опытах *in vivo* использовался конститутивный промотор, а не опухолеспецифический промотор? Но на него автор уже ответил. И другие мои замечания тоже связаны с интерпретацией рисунков 17А и 18А, на которых была тепловая карта обозначена, и нет расшифровки этой тепловой карты. И еще один вопрос, почему все таки была лактопероксидаза выбрана для органификации йода, а не тиреопероксидаза? Но естественно, что все эти замечания малозначительны, малосущественны, не умаляют предпринятых усилий и достигнутых результатов, поэтому мне остается только зачитать мое обращение, как это правильно все формулируется: «Диссертационная работа Кузьмича Алексея Ивановича является самостоятельным и законченным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне,

подтверждающем высокую профессиональную квалификацию соискателя. Объем и научный уровень работы полностью соответствует всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Кузьмич Алексей Иванович заслуживает присуждения ученой степени по искомой специальности». Спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Алексей Иванович, вам слово для ответа на замечания.

Алексей Иванович Кузьмич:

– Вопрос, связанный с описанием конструирования, которое следовало перенести в раздел «материалы и методы», - я согласен. По поводу того, почему мы использовали лактопероксидазу, а не тиреопероксидазу? Я немного поясню, что тиреопероксидаза – это фермент, который также в щитовидной железе как раз отвечает за органификацию захваченного йодида и, в общем-то, синтез тиреоидных гормонов. То есть это естественная органификация, которая происходит в организме. Мы использовали лактопероксидазу. Этот фермент также способен окислять йодид, но с нашей точки зрения он был более удобен, потому что, во-первых, это растворимый белок, секретуруемы растворимый белок, в отличие от тиреопероксидазы, которая заякорена в мембране, и во-вторых, потому что все таки для ее активности не нужен тиреоглобулин, который является специфическим субстратом тиреопероксидазы, то есть она может органифицировать самые разные субстраты за счет окисления йодида. По поводу мочевого пузыря я просто покажу картинку, о чем идет речь. В экспериментах при системной доставке при однофотонной эмиссионной томографии радиопрепарат не накапливался в мочевом пузыре, хотя со стабильно трансфицированными клетками он там был. Это связано с тем, что мы немного изменили схему эксперимента и просто для удобства работы и из опасений того, что выделительная система может доставить нам неприятности при томографии мышей. Мыши за несколько часов до эксперимента были лишены питья, к сожалению такой несколько садистский подход, и поэтому, видимо, почки работали не столь эффективно, радиопрепарат в мочевом пузыре не накапливался. По поводу разных промоторов, мне кажется, я уже ответил.

Вадим Тихонович Иванов:

– Да, так и было. Спасибо. Итак, мы услышали мнение официальных оппонентов. У присутствующих членов ученого совета есть возможность либо добавить аргументов к тем комментариям, либо поспорить с оппонентами. Кто хотел бы поучаствовать в общей дискуссии? Или все аргументы уже были изложены достаточно убедительно? Я так внимательно смотрю на зал и не вижу желающих участвовать в общей дискуссии. Но, тем не

мене, общая дискуссия должна завершаться заключительным словом диссертанта. Если нет желающих выступить, я даю слово диссертанту, чтобы последний раз сегодня на трибуне сообщить нам свои пожелания.

Алексей Иванович Кузьмич:

– Я думаю, что по поводу данной работы можно уже ничего не говорить. Но я бы хотел немного сказать о тех людях, которые участвовали в процессе написания, создания и защиты данной работы. Я бы хотел поблагодарить своего научного руководителя, Свредлова Евгения Давидовича. Мне было очень приятно работать по данному проекту и это очень здорово. Большое спасибо! Также я бы хотел поблагодарить Соболева Александра Сергеевича, Михаила Дурыманова, Татьяну Слестникову и Розенкранца Андрея Александровича. Это наши коллеги из Института биологии гена, значительная доля работы была сделана совместно с ними и, конечно, те яркие результаты, которые вы видели, были получены не без участия этих людей. Огромное спасибо им за это. Я бы хотел поблагодарить Николая Казимировича и Михаила Анатольевича за труд, который они взяли по оппонированию моей диссертации. Спасибо им за прекрасные отзывы. Надеюсь, моя работа была не слишком занудной для ее прочтения. Также я хотел бы поблагодарить сотрудников нашей лаборатории Монастырскую Галину Сергеевну, Копанцева Евгения Павловича и Виноградову Татьяну Викторовну за помощь в организации экспериментов на первых этапах работы. Также хотел поблагодарить Аكوпова Сергея Борисовича, сотрудника нашей лаборатории, и Скоблова Юрия Самойловича, которые помогли мне организовать работу с радиоактивным йодом в стенах нашего института. Я бы хотел поблагодарить сотрудников кафедры молекулярной биологии, которые как раз повлияли на мою способность ставить задачи и ставить контроли и, вообще, щепетильно относиться к проведению экспериментов. И я бы хотел поблагодарить своих родных и своих близких за поддержку и помощь в процессе осуществления и написания данной работы. И хотел бы поблагодарить всех присутствующих, которые пришли послушать и поддержать меня сегодня. Спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо Вам. Понятно. Дальше надо выбирать счетную комиссию.

Евгений Давидович Свредлов:

– Если можно, я еще к спасибо хочу добавить.

Вадим Тихонович Иванов:

– По процедуре это можно было сделать в дискуссии. Хорошо, давайте уж.

Евгений Давидович Свредлов:

– Благодарности к благодарности. Я не могу просто этого не сделать. Я хочу поблагодарить ректора Московского университета, Виктора Антоновича Садовничего. Я говорил, что проект

задумывался гораздо более широко, чем он состоялся. И в нем, в частности, должен был участвовать Биологический факультет, и кафедра радиохимии Московского университета, и Курчатовский институт. И мы с Михаилом Петровичем Кирпичниковым сходили к Виктору Антоновичу, рассказали ему, что для этого проекта нужен этот томограф, о котором говорил, и он выделил деньги Биологическому факультету на закупку этого томографа. В результате эта работа стала возможной. Так что, спасибо! Я думаю, что я не очень процедуру нарушил.

Вадим Тихонович Иванов:

– Будем считать, что это часть дискуссии общей. Я хотел убедиться в том, что у нас подготовлено голосование по поводу проектного заключения, с которым члены ученого совета могли ознакомиться до начала. Есть какие-то замечания по поводу проекта заключения? Прошу, Бовин.

Николай Владимирович Бовин:

– Надо сказать, что я посмотрел и второй проект заключения – и там аналогичная штука. Я не знаю, это связано с исходным документом, на который опирались, то есть может быть там какой-то канонический текст или апокриф, но суть. Суть заключается в том, это страница пятая, «Теоретическая значимость исследования», а потом в качестве теоретической значимости пишется, что «использованы различные методы современной молекулярной биологии». Мне кажется, что это нонсенс.

Вадим Тихонович Иванов:

– Не очень информативно. Я готов согласиться.

Николай Владимирович Бовин:

– То есть это какое-то очень странное противоречие и, если это в исходном тексте, на который мы опираемся, есть, значит, надо это в исходном тексте заменить.

Вадим Тихонович Иванов:

– Нужно наполнять содержанием, по-видимому.

Николай Владимирович Бовин:

– Но вот это надо убрать.

Вадим Тихонович Иванов:

– Не слишком информативно, согласен. Значит, Вы предлагаете убрать то, что написано, и добавить более содержательное обоснование теоретической значимости работы? Сделаем так сейчас: я думаю, нам не привыкать находить разумные формулировки на самые сложные задачи. Поэтому, Евгений Давидович, беретесь, как руководитель, помочь?

Евгений Давидович Свердлов:

– С помощью профессора Бовина.

Вадим Тихонович Иванов:

– Да. Профессор Бовин вроде бы готов поучаствовать.

Николай Владимирович Бовин:

– Тут еще есть пара чисто мелких стилистических замечаний, но это в рабочем порядке.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Значит, мы будем считать, что мы приняли решение, что проект заключения принимается при условии доработки в рабочем порядке, скажем так. В качестве состава счетной комиссии мне подготовили предложение. Не знаю, согласовано оно либо нет, сейчас мы проверим. Без имен и отчеств, без регалий: Габибов, Шахпаронов, Олейников. Есть отводы или самоотводы? Не вижу даже самоотводов. Отлично. Кто поддерживает данный состав счетной комиссии, прошу голосовать. Кто против? Комиссия счетная готова к работе.

– У нас есть все основания объявить короткий перерыв на голосование. Я надеюсь, счетная комиссия сработает оперативно и нам не придется долго ждать итогов подсчета голосов. Значит, голосуем и не расходимся.

Владимир Александрович Олейников:

(оглашает результаты голосования)

– Счетная комиссия. Первая защита была – Кузьмич Алексей Иванович. Роздано бюллетеней – 21, оказалось в урне – 21, «за» – 21, «против» нет, недействительных нет.

Вадим Тихонович Иванов:

– Кто за то, чтобы утвердить заслушанные итоги? Поздравим диссертанта с прекрасной защитой, а нас с успешно проведенной работой. Спасибо за работу.

Председатель диссертационного совета
Академик РАН



Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников