

ОТЗЫВ

официального оппонента

Янковского Николая Казимировича,

доктора биологических наук, профессора, чл.-корр. РАН

на диссертационную работу 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:

03.01.03 - «Молекулярная биология».

Рецензируемая работа посвящена проблеме контроля доставки генных препаратов. Генотерапия является одним из перспективных направлений в создании противоопухолевых препаратов. Адресная доставка генопрепаратов в опухоль предполагает, что экспрессия терапевтических генов будет происходить исключительно в клетках опухоли, поэтому при испытаниях *in vivo* необходимо изучать распределение продуктов экспрессии генопрепарата в тканях животного. Такая задача изящно решается путем использования репортерных генов, белковые продукты которых можно неинвазивными методами выявлять в тканях и органах модельного организма.

В диссертации А.И. Кузьмича описывается разработка репортерной системы на основе натрий-йодидного симпортера, трансмембранного белка, осуществляющего перенос йодид-ионов из внеклеточной среды в цитоплазму. Эта система привлекательна тем, что ряд радиопрепаратов и устройств, применяемых для выявления этого белка в организме млекопитающих, уже долгое время успешно используется в клинической практике. В своей работе А.И. Кузьмичу удалось получить такую репортерную систему и продемонстрировать ее эффективность на модели меланомы в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Чувствительности разработанного подхода оказалось достаточно, чтобы выявить различия в эффективности доставки генов в опухоль, осуществляемой с помощью поликатионных носителей разного состава. Несомненно, такая система

может найти применение в работах по оптимизации средств доставки ДНК. Научная новизна и актуальность работы не вызывает сомнений.

Диссертация 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 литературные данные: биология натрий-йодидного симпортера и его использование в качестве репортерного или терапевтического гена. Отдельно описаны проблемы органификации йодида и использования селективных промоторов в связке с этим репортерным геном. Обзор хорошо структурирован и обобщает данные почти 100 источников.

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 клетках меланомного происхождения.

Вторая часть работы посвящена вопросу взаимосвязи активности промоторов, используемых в экспрессионных конструкциях с репортерным геном, и активности образующегося симпортера. Интерес к этому вопросу вызван тем, что используемые в генных препаратах промоторы, как правило, обладают либо высокой активностью либо высокой специфичностью. На клеточной модели меланомы автор убедительно демонстрирует, что, несмотря на значительную разницу в активности промоторов разных типов специфичности, полученная репортерная система может обеспечивать высокий уровень детектируемого сигнала (поглощение радиоактивного йодида) при использовании достаточно активных неспецифических и тканеспецифических промоторов. При этом опухолеспецифичные промоторы даже в опухолевых клетках могут проявлять слишком низкую активность для детекции экспрессируемого симпортера.

Значительная часть работы касается длительности удержания радиоизотопа, захваченного клетками, экспрессирующими симпортер. Автором было показано, что в условиях *in vitro* захваченный радиойодид быстро вымывается из них. Для предотвращения этого в работе осуществлена попытка удержать захваченный йодид в клетках за счет его внутриклеточного окисления лактопероксидазой, также кодируемой генетической конструкцией. Данный раздел интересен с технической точки зрения, однако, длительное удержание йодида продемонстрировать не удалось.

В последней части диссертации изучен потенциал этой системы для неинвазивной визуализации *in vivo*. Совместно с коллегами из Института биологии гена были проведены эксперименты по выявлению в организме мыши меланомных клеток, продуцирующих репортерный белок. В предварительном эксперименте привитые мышам опухоли меланомы, стабильно продуцирующие натрий-йодидный симпортер, легко выявлялись по поглощению радиоактивного йода методом однофотонной эмиссионной томографии. В ключевом эксперименте мышам с привитыми опухолями

меланомы системно вводили комплексы поликатиона ПЭГ-ПЭИ с плазмидной ДНК, содержащей этот репортерный ген. Достигнутого уровня трансфекции было достаточно для визуализации трансфицированных опухолей по поглощению радиоактивного йода. Более того, чувствительности созданной системы было достаточно, чтобы выявить различия в эффективности между комплексами, содержащими и не содержащими адресный к меланомным клеткам лиганд.

В целом, диссертационная работа А.И. Кузьмича выполнена на самом современном экспериментальном уровне, результаты являются приоритетными. Все части работы хорошо и полно изложены. Рисунки достаточно просты в понимании и хорошо иллюстрируют текст. Сделанные выводы соответствуют полученным в диссертации экспериментальным данным. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. По результатам работы выпущены три статьи, одна из которых опубликована в журнале с высоким импакт-фактором (*Biomaterials*). Полученные данные также были доложены на российских и международных конференциях.

Несмотря на несомненные достоинства работы, у меня есть несколько вопросов и замечаний:

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. 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?

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.

Названные недочеты не умаляют достоинств работы и не снижают общего положительного впечатления. Представленная диссертация является завершенной научно-исследовательской работой, которая по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и новизне, безусловно, удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Диссертационная работа Кузьмича Алексея Ивановича соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 –«Молекулярная биология».

Официальный оппонент

Янковский Николай Казимирович

Доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН

Директор Федерального государственного бюджетного

учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова

Российской академии наук

Заведующий лабораторией анализа генома

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института общей генетики им. Н.И. Вавилова

Российской академии наук

Адрес: 119991. ГСП-1, Москва, ул. Губкина. д.3

Телефон: +7(499)135-62-13, e-mail: director@vigg.ru

Подпись Н.К. Янковского заверяю:

Ученый секретарь ИОГен РАН, д.б.н.



Ю.А. Огаркова/