

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Кузьмича Алексея Ивановича «**Использование натрий-иодидного 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»

Диссертационная работа Кузьмича Алексея Ивановича посвящена созданию репортерной системы на основе гена NIS и изучению особенностей ее работы в клеточных и животных моделях. Реализация целей работы предполагала решение нескольких взаимосвязанных задач, в том числе получение экспрессионных конструкций с геном NIS под контролем различных промоторов, оценку активности NIS, транзистентно-экспрессируемого в меланомных клетках, исследование параметров системы на основе NIS *in vitro* и *in vivo*, оценку эффективности доставки гена NIS в опухоли меланомы при системном введении генно-терапевтических препаратов (ГТП) в организм животных, изучение возможности задержки иодида в клетках с помощью экспрессионных конструкций, содержащих ген лактопероксидазы мыши для усиления внутриклеточного окисления иодида.

Актуальность темы диссертационной работы

Натрий-иодный симпортер – один из наиболее популярных генов для использования в системах направленной доставки ГТП, сочетающий в себе свойства как высокочувствительного репортера для биовизуализации попадания ГТП в клетки-мишени, так и терапевтического гена для использования в системах радио-иод-терапии опухолей. Максимальное использование потенциала NIS для этих целей предполагает как создание эффективных конструкций для транзистентной экспрессии NIS, так и методов его адресной доставки, включая способы мониторинга такой доставки в режиме реального времени.

В этой связи не вызывает сомнения актуальность и важность диссертационной работы А.И. Кузьмича, направленной на создание и характеристику системы транзистентной экспрессии гена NIS в клетках меланомного происхождения и изучению ее эффективности в плане адресной доставки ГТП в клетки опухоли *in vivo*.

Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы

Работа выполнена на высоком современном экспериментальном уровне с привлечением широкого арсенала методов генетической инженерии, молекулярной и клеточной биологии, рентгеновской и эмиссионной томографии, генотерапии. Результаты экспериментов в целом подробно документированы и подвергнуты статистической обработке. Результаты работы представлены на престижных научных конференциях в виде докладов и печатных тезисов.

В итоге предпринятого достаточно трудоемкого и кропотливого исследования была создана серия векторов на основе гена NIS под контролем регуляторных элементов различной активности и специфичности, способных обеспечивать эффективную транзистентную экспрессию функционально-активного NIS. Была выявлена нелинейная зависимость между активностью промотора и уровнем содержания NIS в клетках, отражающая наличие определенного биологического барьера.

На модели мышинной меланомы была показана возможность биовизуализации клеток опухоли, стабильно экспрессирующих NIS, с помощью ОФЭКТ, а также привитых опухолевых клеток после системного введения репортерного гена в составе полиплексов на основе поликатионного полимера. При этом в рамках данного подхода удалось показать, что полиплексы, содержащие специфический лиганд, обеспечивают более высокий уровень доставки гена. Совокупность полученных результатов говорит о перспективности использования созданной репортерной системы в области разработки систем доставки генетического материала.

Хотя попытка автора повысить время удержания вводимого радио-иодида в клетках опухоли за счет коэкспрессии вместе с геном NIS гена лактопероксидазы мыши и не увенчалась успехом, эти эксперименты, несомненно, помогут в дальнейшем найти другой способ оптимизации «NIS-зависимых тераностических систем».

Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики

В рамках данной работы была создана репортерная система на основе гена NIS, позволяющая неинвазивными методами отслеживать эффективность доставки ГТП в ткань опухолей животных. На клеточных моделях меланомы мыши и человека впервые была исследована связь активности промотора, контролирующего экспрессию NIS, с активностью образующегося в клетках симпортера. Проведено сравнение промоторов трех типов: сильного неспецифического, умеренно активного меланомоспецифического и слабых опухолеспецифичных промоторов, активных в широком спектре опухолевых клеток. Было показано, что при значительных различиях в промоторной активности функциональная активность NIS, образующегося при использовании этих промоторов, изменялась слабо. Эти факты открывают новые возможности для повышения специфичности ГТП на основе NIS. В системах *in vitro* были изучены кинетические параметры репортерной системы на основе NIS, и выявлены ее определенные ограничения, связанные с быстрой потерей иода клетками в отсутствие радиопрепарата. Была исследована возможность повышения эффективности системы путем коэкспрессии NIS с геном лактопероксидазы, способной катализировать окисление иодида. Хотя этот подход не привел к желаемому эффекту, проведенные эксперименты, несомненно, будут способствовать поиску других путей улучшения удержания захваченного радио-иодида в клетках.

Созданная репортерная система была использована для изучения эффективности доставки ГТП в опухоли меланомы *in vivo*. С использованием однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) была продемонстрирована повышенная эффективность лигандированных полиплексов для адресной доставки ГТП в клетки меланомы.

Прикладное значение работы состоит, прежде всего, в расширении возможностей применения системы на основе натрий-иодидного симпортера в диагностических и терапевтических целях.

Содержание диссертации

Работа построена по традиционной схеме. Диссертационная работа изложена на 101 странице и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, основных выводов и списка литературы из 94 наименований. Диссертация содержит 3 таблицы и 18 рисунков.

Во введении Кузьмич А.И. останавливается на актуальности и научной новизне темы диссертационной работы, характеризует объект и методы исследования, формулирует цели и задачи диссертации, приводит данные о практической ценности результатов, области их применения, апробации работы и список публикаций по теме исследования.

Обзор литературы состоит из четырех частей. Первая, по сути, вводная, часть посвящена общей характеристике стратегий генной терапии. После краткого перечисления перспектив и основных направлений генотерапевтического вмешательства, автор справедливо отмечает, что клиническая эффективность многих генотерапевтических подходов далеко не всегда оправдывает ожидания исследователей и пациентов. Как верно указывает автор, оптимизация протоколов генной терапии требует разработки чувствительных и малоинвазивных методов биовизуализации, позволяющих изучать биораспределение и фармакокинетику генопрепаратов в режиме реального времени. Основа таких методов - различные репортерные системы, основанные на

применении гена белка-репортера и специфичного к нему зонда. А.И.Кузьмич формулирует требования, которым должны удовлетворять такие системы, и во второй части обзора переходит к более подробному их рассмотрению. Три основные группы систем – оптические, радионуклидные и ЯМР-зависимые автор классифицирует по таким параметрам, как разрешающая способность, глубина проникновения, доступность инъецируемых биосовместимых зондов, стоимость и чувствительность детекции сигнала от зонда. Важное преимущество радионуклидных систем, несмотря на сложность работы и нестабильность, их высокая чувствительность, неограниченная глубина визуализации, широкий спектр разрешенных к применению в клинике проб и т.д.

В третьей части обзора автор переходит к более подробной характеристике таких систем, выделяя ферментативные, рецепторные и транспортерные, отмечая их сравнительные преимущества и недостатки. Непосредственным объектом экспериментальных исследований автора является натрий-йодидный симпортер NIS, поэтому вполне оправдано то особое внимание, которое автор уделил биологическим особенностям NIS и применению NIS в генной терапии в заключительной части обзора.

Автор последовательно излагает известные сведения о значении иода для биосинтеза тиреоидных гормонов, данные о роли NIS и ферментных систем органификации иода в доставке и удержании иода в фолликулах щитовидной железы, использовании этого эффекта в радио-йод-диагностике и радио-йод-терапии.

Далее следует перечисление данных об организации генов NIS человека, мыши, крысы, особенностях функционирования этих белков, их физиологической роли в различных органах и тканях млекопитающих, истории использования гена NIS для неинвазивной визуализации опухолей *in vivo*.

Как справедливо отмечает А.И.Кузьмич, на протяжении последних более чем 15 лет наблюдается взрывной интерес к использованию гена NIS в качестве репортера в генной терапии, терапии онколитическими вирусами, клеточной терапии, что определяется такими его преимуществами, как способность к «амплификации» сигнала за счет накопления лиганда внутри клеток, незначительность воздействия на общую физиологию клетки-хозяина, «совместимость» со многими широко используемыми в клинике радиофармпрепаратами. Весьма убедительны приведенные примеры использования NIS в различных клинических испытаниях, в частности, для терапии рака с помощью онколитических вирусов. Хотя вопрос о применимости NIS для мониторинга доставки с помощью невирусных систем *in vivo* изучен гораздо слабее, приведенные в этой части обзора работы убедительно свидетельствуют в пользу перспективности применения NIS и в таких вариантах генной терапии тоже.

Другая важная привлекательная особенность NIS – его высокий потенциал не только в качестве диагностического, но и терапевтического гена, способного индуцировать радиоактивную деструкцию опухолевых клеток, накапливающих различные фармпрепараты – лиганды NIS – например, изотоп иода 131, перренат, астатид. Но и в этой крайне перспективной области, как точно указывает А.И.Кузьмич, остается много нерешенных вопросов. Для достижения максимальных терапевтических эффектов необходимо преодолеть многие характерные для опухолевых клеток барьеры, препятствующие транспорту белка NIS к плазматической мембране, эффективному поглощению и удержанию радиофармпрепарата в клетке и т.п.

Важным фактором является обеспечение высокой экспрессии гена NIS в целевых клетках, и для этой цели, как справедливо указывает автор, целесообразно использовать опухолеспецифичные промоторы. Приведенные автором примеры в основном касались использования вирусных векторов для доставки гена NIS под контролем таких промоторов.

В заключение автор констатирует, что исследования по сравнительной эффективности различных промоторов для экзогенной экспрессии гена NIS ранее не

проводились, убеждая тем самым читателя в актуальности и важности данной диссертационной работы.

В целом обзор производит приятное впечатление, он неплохо структурирован, информативен, удачно предваряет экспериментальную часть работы. Ознакомление с данной главой диссертационной работы может быть полезно другим исследователям, занимающимся проблемами противоопухолевой генотерапии.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание внушительного набора методов генетической инженерии, молекулярной биологии, генной терапии, энзимологии, иммунологии, использованных в работе, в том числе проведенных совместно с лабораторией проф. А.С. Соболева чувствительных и эффективных приемов выявления распределения изотопа ^{123}I и его накопления в опухолях с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии. Знакомство с этим разделом диссертации убеждает в высоком, разнообразном и современном экспериментальном уровне этой работы.

Первый этап экспериментальной работы А.И.Кузьмича заключался в создании экспрессионных векторов, несущих ген rNIS в качестве репортера. С помощью ОТ-ПЦР автор выделил искомую полноразмерную копию гена и создал панель конструкций, содержащих ген NIS под контролем различных промоторов, которые обеспечивали высокий детектируемый уровень транзientной экспрессии функционального NIS в клетках меланомы мыши и человека.

Оценка использованных промоторов с помощью репортерного гена люциферазы позволила провести их предварительное ранжирование по критерию сила/специфичность и установить, что активность выбранных регуляторных элементов в клетках меланомы различается более чем на 2 порядка.

При этом умеренная активность меланомоспецифичного промотора 3ET-rMIA в условиях транзientной трансфекции обеспечивала высокий уровень активности NIS , сопоставимый с уровнем, обусловленным значительно более сильным промотором rCMV . Другие опухолеспецифичные промоторы - pmSURV и phTERT-CMVmin также обеспечивали достаточно высокий уровень NIS в клетках меланомы человека. Полученные данные показали, что для репортерной системы на основе NIS характерна нелинейная зависимость уровня поглощения радиоактивного иодида клетками от уровня экспрессии гена NIS в клетках. Эти результаты подтверждают ранние независимые наблюдения других авторов в пользу существования некоего предельного уровня поглощения радиоактивного иода клетками.

Автор обсуждает различные биологические механизмы, связанные с формированием данного барьера и делает справедливый вывод о том, что наблюдаемый эффект может объясняться комбинацией различных факторов и отличаться в системах *in vitro* и *in vivo*.

На важность удержания захваченного иода для максимизации его внутриклеточных эффектов указывают последующие эксперименты автора, посвященные изучению диффузии радио-иодида из клеток, экспрессирующих NIS , в условиях *in vitro*. Как оказалось, захваченный трансфецированными клетками M3 изотоп быстро из них вымывается, что, конечно, должно ограничивать диагностический и терапевтический потенциал разрабатываемой системы. Для преодоления этого недостатка автор предпринял попытку разработки системы органификации иода, основанной на экспрессии лактопероксидазы мыши, модифицированной для удержания в эндоплазматическом ретикулуме (LPO-E). Была создана специальная «бицистронная» конструкция, которая обеспечивала высокую транзientную экспрессию обоих белков - NIS и LPO-E . К огорчению автора, такой подход не позволил добиться желаемого и повысить фиксацию иода в клетке. По-видимому, предложенная система не работает либо требует серьезной доработки.

Последующие эксперименты автора связаны с оценкой генотерапевтического потенциала NIS в системе *in vivo*. Для подбора условий детекции NIS-позитивных клеток в организме мышей с помощью лентивирусного вектора была получена линия клеток мышинной меланомы M3, стабильно трансфицированная экспрессионной кассетой с геном rNIS. По истечении 10 суток после прививки такой опухоли мышам вводили препарат радиоактивного иода и отслеживали его биораспределение с помощью ОФЭКТ/КТ. Полученные данные подтвердили значительное накопление введенного радио-иодида в привитой опухоли и в тканях с естественной экспрессией NIS, при этом уровень захвата радиоизотопа в опухоли был достаточно высок для ее визуализации на фоне остальных NIS-позитивных органов. При этом скорость выведения радиоизотопа из опухоли оказалась достаточно низкой, что позволяет проводить мониторинг распределения радиопрепарата в течение нескольких часов после его введения. Убедившись в надежности визуализации NIS-позитивных клеток с использованием такой методологии, автор приступил к изучению ее работы в условиях системной доставки генетического материала в опухоли меланомы. В качестве средства доставки использовали полиплексы, содержащие пептидный лиганд, селективный к специфичному для клеток меланомы меланокортиновому рецептору, а в качестве вектора - плазмиду pCMV-rNIS. Согласно полученным данным, при системном введении лигандированных полиплексов удалось добиться уровня экспрессии репортерного гена rNIS, достаточного для визуализации опухоли и обеспечивающего накопление до 7% от введенной дозы на грамм ткани. Хотя полиплексы с MC1SP-лигандом обеспечивали почти в два раза большее накопление радио-иодида в трансфицированной опухоли по сравнению с нелигандированными полиплексами, этот уровень доставки является относительно низким, что автор объясняет действием сосудистого барьера, а также ограниченной диффузией полиплексов внутри опухоли.

На основании полученных результатов и их подробного обсуждения автор формулирует шесть выводов, полностью обоснованных представленными экспериментальными данными и не противоречащих данным научной литературы.

Замечания и недочеты работы

Работа А.И. Кузьмича не свободна от некоторых недостатков. Встречаются отдельные опечатки, неточности, неудачные обороты, погрешности оформления.

Более существенные замечания, вопросы, рекомендации:

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».
2. В работах по органификации иодида, рассмотренных в литературном обзоре, использовалась тиреопероксидаза, которая осуществляет данный процесс в норме в щитовидной железе. Из текста диссертации неясно, почему в качестве иодид-окисляющего фермента была выбрана лактопероксидаза?
3. Большинство изученных промоторов названы специфичными, при этом в диссертации нет экспериментальных данных, подтверждающих их опухолевую или тканевую специфичность.
4. При изучении распределения изотопа в мышцах с опухолями, стабильно-экспрессирующими симпортер, на 3D-проекциях иод 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?
5. В опытах *in vitro* автор показал, что плазмиды с геном NIS под контролем промоторов pCMV и 3ET-pMIA обеспечивают сходный высокий уровень транзientной экспрессии

NIS *in vitro*. Непонятно, почему автор ограничился использованием только одной «конститутивной» конструкцией *in vivo* и не стал использовать вариант с опухолеспецифичным промотором?

Упомянутые недочеты и пожелания не носят принципиального характера и не снижают высокого теоретического и экспериментального уровня проделанной работы.

Опубликование результатов диссертации в научной печати

Результаты работы Кузьмича А.И. представлены в виде печатных тезисов на 6 отечественных и международных конференциях, а также отражены в 3 статьях в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, причем в двух из них соискатель является первым автором.

Содержание автореферата

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертационной работы и требованиям ВАК РФ.

Заклучение

Диссертационная работа Кузьмича Алексея Ивановича является самостоятельным и завершенным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне, подтверждающем высокую профессиональную квалификацию соискателя. Представленная работа вносит существенный вклад в разработку генотерапевтических средств, использующих транспортеры радионуклидных препаратов, содержит описание создания подобной системы на основе гена натрий-йодидного симпортера крысы, позволяющей неинвазивными методами отслеживать эффективность доставки нуклеиновых кислот в ткань опухолей животных. 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 кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук
Руководитель группы генетической инженерии грибов,
ведущий научный сотрудник
Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»,
Институт Биоинженерии,
Адрес: 119071 Россия, Москва,
Ленинский пр-т, 33.2
Тел. (499) 135-62-19;
e-mail: meldarov@mail.ru



М. А. Эльдаров

Подпись к.б.н. М. А. Эльдарова заверяю
Зам. Ученого секретаря
ФИЦ Биотехнологии РАН
к.б.н.

Н.Г. Степанова