

Отзыв официального оппонента на диссертационную работу Смирнова И. В.

**«СОЗДАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ
АНТИТЕЛ К ЭНДОГЛИНУ, МАРКЕРУ
МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ЭНДОТЕЛИЯ»,**

представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук
(специальность 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология)

Актуальность и новизна диссертационного исследования

Эндоглин представляет собой мембранный гликопротеин, локализованный преимущественно на поверхности клеток эндотелия и мезенхимных стволовых клеток. Он рассматривается в качестве одного из важных маркеров для идентификации этих клеток. Эндоглин принимает участие в регуляции процессов эмбрионального, репаративного и опухолевого ангиогенеза. Выявление эндоглина имеет важное клинко-диагностическое значение при различных заболеваниях человека. Так, например, по степени экспрессии данной молекулы в биоптатах солидных опухолей можно проводить дифференциацию сосудов нормальных и неопластических тканей. Выявление растворимой формы эндоглина в крови и моче является информативным показателем для мониторинга роста и метастатической активности опухолей у онкологических больных, оценки вероятности развития преэклампсии у беременных женщин, а также прогноза течения атеросклеротических процессов.

Все вышесказанное обуславливает необходимость создания биотехнологических средств для выявления эндоглина в тканях и биологических жидкостях человека. Для этой цели в мире в основном используют моноклональные антитела к эндоглину или созданные на их основе диагностические наборы. Однако, несмотря на большое количество созданных в западных лабораториях моноклональных антител эндоглину, лишь немногие из них охарактеризованы с достаточной полнотой, а сведения о подобных реагентах, полученных на территории Российской Федерации, отсутствуют.

И.В. Смирнов впервые на территории Российской Федерации провел разработки и создал новую панель моноклональных антител к эндоглину человека. Эти антитела были полностью охарактеризованы иммунохимически и определен круг методов их возможного использования. На основе этих антител была создана новая высокочувствительная двухцентровая система для иммуноферментного анализа, позволяющая проводить количественное определение содержания эндоглина в плазме крови больных и здоровых людей. Применение данного метода впервые позволило установить, что уровень эндоглина в плазме крови доноров существенно выше, чем считалось ранее, также как и содержание

этого фактора в крови женщин с преэклампсией. Созданные реагенты и тест-системы могут быть использованы как в прикладных, так и в фундаментальных исследованиях.

Общая характеристика работы

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 161 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 383 источника. Материалы диссертации иллюстрированы 40 рисунками и 10 таблицами.

В обзоре литературы приведены обширные данные о структуре эндоглина, его экспрессии в тканях и роли в патогенезе различных заболеваний человека. Также подробно разбираются имеющиеся в научной литературе характеристики моноклональных антител к эндоглину и области их применения. В целом обзор литературы продемонстрировал достаточно глубокие знания автора в изучаемой области.

В главе «Материалы и методы» приводится достаточно полное и адекватное описание использованных методов. В своей работе И.В. Смирнов использовал широкий спектр современных методов, включающих культуру ткани, гибридомную технологию, флуоресцентную микроскопию, иммуногистохимию, иммуноферментный анализ, вестерн-блот и проточную цитометрию. Все использованные в работе методы адекватны поставленным задачам. Результаты обработаны статистически, количество проведенных экспериментов достаточно для обоснования основных положений, выносимых на защиту.

Результаты исследования изложены в главе 3. Глава начинается с подробного описания способа получения гибридом-продуцентов моноклональных антител к эндоглину человека. Здесь автор применяет новые методические приемы и впервые в качестве доноров иммунных спленцитов использует мышей F1(SJL/J×BALB/c) вместо традиционных мышей линии BALB/c. Приводятся убедительные данные о преимуществах такой замены. На основе сопоставления полученных автором результатов с данными литературы показано, что репертуар эпитопных специфичностей иммунного ответа этих животных отличается от такового у мышей линии BALB/c.

Далее автор проводит тщательное исследование иммунохимических свойств полученных антител и определяет круг методов, в которых можно использовать данные антитела. На основании этих данных полученные антитела рекомендованы для проведения клинико-иммунологических исследований с помощью иммуногистохимии, вестерн-блота, проточной цитометрии и иммуноферментного анализа.

В следующем разделе работы описано, как на основе полученных моноклональных антител была создана двухцентровая система иммуноферментного анализа для количественного определения растворимой формы эндоглина. Разработанная автором тест-

система сравнивается с аналогичным коммерческим набором иностранного производства и приводятся данные о том, что система, разработанная И.В. Смирновым, значительно превышает коммерческий набор по чувствительности и позволяет выявлять в среднем на два порядка большие уровни эндоглина в плазме человека. Это является существенным преимуществом как для клинического анализа, так и для фундаментальных исследований в области клеточной биологии, поскольку позволяет отслеживать накопление небольших концентраций антигена в культуральной среде. Другим преимуществом разработанной системы также является более высокая скорость проведения анализа (в 2,5 раза быстрее) по сравнению с использованием коммерческого набора.

Наиболее значимыми, как нам представляется, являются данные клинического применения созданной автором двухцентровой системы для диагностики преэклампсий у беременных. У женщин с патологией беременности были выявлены уровни эндоглина в крови более чем в 2 раза превышающие его уровень у женщин с нормально протекающей беременностью. Поскольку из данных литературы известно, что повышение уровня эндоглина в крови матери предшествует появлению симптомов преэклампсии, этот метод может быть использован как важный диагностический маркер одного из самых опасных осложнений беременности.

В конце главы 3 приводятся данные о возможности применения созданных моноклональных антител в качестве инструментов для изучения биологии клетки. В частности, показана возможность изучения экспрессии эндоглина клетками эндотелия и мезенхимальными стволовыми клетками в культуре, динамики обновления эндоглина на мембране клеток, а также продукции растворимого эндоглина клетками.

Работа заканчивается 5 обоснованными выводами, которые соответствуют поставленным задачам и вытекают из полученных результатов. Достоверность научных положений и выводов диссертации подтверждена набором современных методов исследования, достаточным количеством исследованных животных, информативными статистическими методиками обработки данных. Также следует подчеркнуть высокое качество обработки материала, его представления в виде рисунков и таблиц, а также их обстоятельного описания и квалифицированного анализа. Все это позволяет оценить результаты диссертационной работы как достоверные, а основные положения, выносимые на защиту и выводы как вполне обоснованные.

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 3 статьи (2 статьи в рецензируемых научных журналах из перечня ВАК и 1 статья в рецензируемом иностранном журнале) и 5 тезисов. Поданы две заявки на изобретения, по которым приняты положительные решения. Автореферат и опубликованные работы полностью отражают

содержание диссертации, ее выводы и основные положения. Данные были неоднократно представлены на различных научных конференциях.

Замечания, вопросы

Принципиальных возражений и замечаний по диссертационной работе у оппонента нет, но имеются некоторые вопросы:

1. Насколько выражены межвидовые различия эндоглина, и можно ли использовать Ваши антитела для выявления этого фактора у мышей?
2. Хотелось бы услышать Ваше мнение о перспективах производства разработанных Вами реактивов в нашей стране.

Заключение

В целом диссертация И.В. Смирнова, выполненная на высоком научном и методическом уровне, заслуживает высокой оценки. Считаю, что по актуальности, поставленным целям и задачам, объему проведенных исследований, новизне полученных результатов, их научной и практической значимости, диссертационная работа И.В. Смирнова «Создание и характеристика моноклональных антител к эндоглину, маркеру мезенхимных стволовых клеток и эндотелия», выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора В.Б. Климовича и доктора биологических наук, академика РАН, профессора Н.Н. Никольского, является законченной квалификационной работой и полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения научных степеней» (утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Руководитель лаборатории иммунорегуляции отдела иммунологии

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

доктор медицинских наук

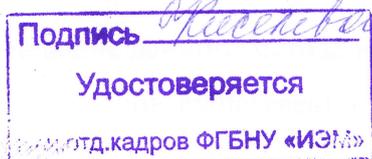
Киселева Екатерина Прохоровна

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

тел. 234-16-69, ekissele@yandex.ru

21.02.2017



Е. А. Киселева