

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации

Смирнова Ильи Валерьевича: «Создание и характеристика моноклональных антител к эндоглину, маркеру мезенхимных стволовых клеток и эндотелия», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология».

Эндоглин (CD105) – гомодимерный мембранный гликопротеин является компонентом рецепторных комплексов к факторам из семейств TGF- β , BMP и активина. Эндоглин преимущественно экспрессирован на поверхности клеток эндотелия, перицитов (их отождествляют с мезенхимными стволовыми клетками) и некоторых других типах клеток организма. Существенно, что в очагах ангиогенеза плотность молекул эндоглина на вновь сформированном эндотелии на несколько порядков выше, чем на сосудах нормальных тканей. Помимо эндотелия эндоглин обнаружен на мембранах клеток ряда опухолей. Причины появления этой молекулы и ее роль в биологии трансформированных клеток остаются мало изученными.

Растворимая форма эндоглина (sEng), которая циркулирует в крови человека, образуется в результате ферментативного отщепления фрагмента экстраклеточного участка молекулы.

Развитие ряда заболеваний человека зависит от процессов ангиогенеза. Образование новой капиллярной сети состоит из нескольких этапов, регуляция которых осуществляется посредством цитокинов, образования межклеточных контактов и взаимодействия клеток с элементами матрикса. Эндоглин играет в этих процессах важную, но до конца не выясненную роль.

Эндоглин рассматривают как одну из мишеней для анти-ангиогенной терапии опухолей, поскольку известно, что прогрессия солидных новообразований напрямую связана с формированием локальной сосудистой системы. Есть данные о том, что растворимый эндоглин обладает анти-ангиогенными свойствами, поскольку может выступать в качестве рецептора-ловушки для ростовых факторов, а также изменять адгезию эндотелиальных клеток к базальной мембране и другим клеткам.

Инструментом для выявления и изучения эндоглина являются моноклональные антитела (МКАТ). В зарубежных лабораториях, начиная с конца 80-х годов, получено несколько десятков МКАТ к этому антигену. Однако только немногие из этих реагентов охарактеризованы с достаточной полнотой. На основе одного из таких реагентов были

созданы гуманизированные МКАТ. В настоящее время их рассматривают в качестве средства для блокирования взаимодействия рецептора с молекулой BMP-9. Таким образом эти антитела оказывают ингибирующий эффект на ангиогенез в солидных опухолях.

Рецензируемая работа И.В.Смирнова посвящена созданию, характеристике и определению областей использования нового семейства МКАТ к эндоглину человека.

Цели и задачи исследования, пути их решения

Цель работы И.В.Смирнова состояла в получении и характеристике нового семейства МКАТ, распознающих как мембранную, так и растворимую формы эндоглина. Задачи работы фактически подразделяются на несколько разделов, для решения которых требовались специальные подходы и применение самых разнообразных методик. Большой раздел работы посвящен получению и характеристике рекомбинантных молекул эндоглина и исследованию их иммуногенности для мышей F1(SJL/J x BALB/c). Следующий раздел работы заключался в непосредственном получении нового семейства гибридом-продуцентов МКАТ к эндоглину и исследованию их иммунохимических свойств. Полученная иммунохимическая характеристика нескольких групп МКАТ позволила определить области их применения: в качестве тест-систем для количественного определения растворимого эндоглина в биологических жидкостях, в качестве реагентов для выделения и анализа растворимого эндоглина методами иммунопреципитации и иммуноблотинга, в качестве реагентов для визуализации антигена в гистологических препаратах или для изучения роли эндоглина в биологии живых клеток.

Объем и структура диссертации

Диссертация И.В.Смирнова изложена на 161 странице, содержит 40 рисунков и 10 таблиц. Библиография включает 383 источника. Работа имеет классическую структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методик исследования, результатов экспериментов, обсуждения, выводов и списка цитированной литературы.

В обширном обзоре литературы, занимающим 59 страниц, автором представлены практически все имеющиеся к настоящему моменту сведения относительно биохимической структуры эндоглина и его пространственной организации, экспрессии эндоглина в тканях и клетках и взаимодействие эндоглина с растворимыми факторами и их рецепторами. Очень подробно описаны пути и механизмы сигналинга эндоглина в клетках. Отмечена значительная роль эндоглина в ангиогенезе и связанных с ним процессов миграции, пролиферации клеток и их инвазии. При анализе литературных источников автором

отмечены нередко противоречивые данные, свидетельствующие о многогранности взаимосвязи эндоглина с многочисленными клеточными факторами, а также, различием результатов, полученных экспериментально *in vivo*, *in vitro* и при изучении роли эндоглина в патогенезе заболеваний человека. Раздел, посвященный анализу литературы относительно получения МКАТ к эндоглину в мировой практике, занимает 17 страниц. И.В.Смирнов подробно анализирует характеристику полученных МКАТ и их широкое применение в диагностике и терапии опухолевых заболеваний. Обзор литературы сопровождают 9 рисунков и 4 таблицы, созданные автором.

Хочется отметить широту интересов И.В.Смирнова и высокий профессионализм при анализе и интерпретации большого объема источников литературы, свидетельствующий о глубине знаний и полноте понимания данной проблемы

Раздел «Материалы и методы» написан четко, с пониманием и с достаточной степенью подробности, свидетельствующей о том, что соискатель своими руками и со знанием дела выполнял экспериментальную часть исследования. Методики, используемые И.В.Смирновым, относятся к различным областям: молекулярной биологии, генной инженерии, гибридной технологии, иммунологии, клеточной биологии, статистическому анализу, что свидетельствует о многогранной подготовке и высокой квалификации автора.

Раздел, посвященный изложению результатов, написан четко, достаточно подробно и хорошо иллюстрирован.

Характеристика результатов и анализ выводов

Результаты диссертационной работы, представленной И.В. Смирновым, состоят из нескольких разделов, каждый из которых является самостоятельным исследованием.

Прежде чем приступить к работе по получению МКАТ, методика которой хорошо разработана в лаборатории гибридной технологии, автор провел большую подготовительную работу по исследованию иммуногенности рекомбинантных молекул эндоглина, полученных самостоятельно в клетках *E. coli* и коммерческих рекомбинантных молекул, синтезированных клетками мышины миеломы NSO. На основании проведенного *in silico* анализа молекул эндоглина мыши и человека автор делает вывод о том, что различные фрагменты эндоглина человека могут обладать высокой иммуногенностью для мышей. Исследование сывороток иммунизированных мышей показало, что, несмотря на физико-химические различия, рекомбинантные молекулы Eng-fr, Eng-C и Eng-NSO обладали высокой иммуногенностью для мышей F1(SJL/J x BALB/c). Однако тестирование в ИФА на клетках HEP G2, показало, что только антитела от мышей, иммунизированных Eng-NSO,

имеющих вторичные модификации в полипептидной цепи, обладали способностью распознавать мембранную форму антигена.

Полученные результаты определили выбор спленоцитов для проведения гибридизации, в процессе которой и при использовании двух вариантов скрининга ростовых сред клеток-продуцентов: в ИФА с рекомбинантными молекулами эндоглина и в ИФА на клетках НЕР G2, было получено и охарактеризовано 12 штаммов гибридом-продуцентов МКАТ к эндоглину человека. Изучение иммунохимических свойств полученных МКАТ показало различия в способности взаимодействовать с рекомбинантными молекулами эндоглина, адсорбированными на твердую фазу, и рецепторами, экспрессированными на мембране клеток НЕР G2, и что эти различия были связаны с вторичной структурой антигенных детерминант: конформационными и линейными. Изучение взаимного расположения детерминант, распознаваемых созданными МКАТ, на поверхности антигена показало неравномерность их распределения. Эпитопы семи реагентов частично перекрывались друг с другом, а детерминанты пяти других МКАТ были пространственно изолированы от всех остальных.

Разнообразие иммунохимических свойств полученных МКАТ позволило автору использовать их в качестве специфических реагентов в различных иммунологических методах. Реагенты 2Е1 и 4В7, направленные к линейным эпитопам антигена, обеспечивали выявление эндоглина методами вестерн-блота и иммуногистохимии. МКАТ к конформационным эпитопам эндоглина могли быть использованы для выявления и количественной оценки экспрессии эндоглина на поверхности клеток. Сочетание методов определения антигена в ИФА и метода проточной цитофлуориметрии показало присутствие эндоглина на мембранах клеток МСК, клетках эндотелия EA.hy926, ECV-304, гепатокарциномы НЕР G2, глиобластом A172 и T98G. С помощью метода иммунофлуоресценции И.В. Смирновым была подтверждена мембранная локализация антигена на всех исследованных клетках. Кроме этого, автором получены результаты, указывающие на отсутствие кросс-реактивности реагентов с молекулами эндоглина мыши.

Таким образом, в результате работы по получению МКАТ к эндоглину человека и проведенных иммунохимических исследований И.В.Смирновым была создана панель моноклональных антител способных специфически выявлять молекулы эндоглина с помощью методов вестерн-блота, иммуногистохимии, проточной цитофлуориметрии и иммунофлуоресценции.

На основе МКАТ, направленных к удаленным друг от друга эпитопам эндоглина И.В. Смирновым была создана серия двухцентровых систем ИФА, которая позволяла выявлять разные концентрации молекул антигена в биологических жидкостях, в частности, в плазме

крови человека. Созданная автором система на основе реагентов 4Е4 и 4С9 была способна определять максимальные уровни антигена, превышающие на два порядка значения, полученные с помощью коммерческого набора. Автором было показано, что различные пары МКАТ выявляли разное содержание антигена в одних и тех же образцах. С помощью метода вестерн-блота была выявлена гетерогенность молекул эндоглина, выделенных из плазмы крови. МКАТ 2Е1 позволяли детектировать четыре фракции белка, чьи молекулярные веса варьировали от 62 до 90 кДа. На основании полученных результатов и данных, приведенных в литературе, автор выдвигает предположение о том, что причиной расхождения результатов измерения его концентраций с помощью разных систем ИФА, является молекулярная гетерогенность растворимого эндоглина. Различные пары МКАТ выявляли разные фракции молекул эндоглина из-за того, что распознаваемые ими эпитопы отсутствовали или были закрыты лигандами на части молекул. Несмотря на это, все исследованные системы ИФА детектировали увеличение уровня растворимого эндоглина в плазме крови у беременных женщин по сравнению со здоровыми женщинами, а также избыточную продукцию антигена у женщин с преэклампсией. И.В. Смирнов отмечает, что системы ИФА, детектирующие избыточно образующиеся фрагменты антигена, могут обладать большей диагностической точностью. Так, с помощью метода вестерн-блота им было показано, что в плазме крови здорового донора и ростовой среде клеток эндотелия EA.hy926 наблюдается различное соотношение фракций растворимого эндоглина. Таким образом, при определенных физиологических условиях интенсивность образования одних фрагментов эндоглина может превалировать над уровнем продукции других фракций антигена.

Созданная И.В. Смирновым панель МКАТ и серия двухцентровых систем ИФА открывают широкие возможности для разностороннего изучения роли молекул эндоглина в биологии клеток. Автором показано, что экспрессия рецептора на поверхности МСК, локализация и динамика обновления молекул эндоглина на мембранах клеток находились в зависимости от условий культивирования клеток. Кроме этого, была отслежена динамика накопления растворимой формы эндоглина в ростовых средах клеточных культур, а также специфичность их выделения для последующего анализа с помощью вестерн-блота.

Все результаты, полученные в работе, подвергнуты грамотной статистической обработке. Выводы полностью отражают полученные автором результаты.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

В исследовании Смирнова И.В. получены новые научные данные. Так, впервые в качестве доноров иммунных спленоцитов для получения гибридом-продуцентов МКАТ против эндоглина были использованы мыши F1(SJL/J x BALB/c), репертуар эпитопных

специфичностей иммунного ответа которых отличается от такового у мышей линии BALB/c. Разработанная система двухцентровых систем с использованием различных МКАТ показала, что уровень растворимого эндоглина в плазме крови человека существенно выше, чем считалось ранее. Система ИФА, основанная на МКАТ 4E4 и 4C9, позволила выявлять в среднем на два порядка большие уровни эндоглина и значения концентрации эндоглина существенно ближе к истинному содержанию антигена, чем величины, определенные в коммерческом наборе. С помощью метода вестерн-блота показана молекулярная гетерогенность антигена, находящегося в периферической крови и культуральной жидкости клеток эндотелия человека. Результаты, полученные в работе, свидетельствуют о необходимости пересмотра существующих представлений об уровне растворимого эндоглина в плазме крови человека.

Практическая значимость работы И.В. Смирнова состоит в создании первой на территории Российской Федерации панели МКАТ, обеспечивающей выявление эндоглина с помощью методов вестерн-блота, иммуногистохимии, иммунофлуоресценции и проточной цитофлуорометрии. Разработана и охарактеризована двухцентровая система ИФА, позволяющая проводить количественное определение содержания эндоглина в плазме крови человека. Созданные реагенты и тест-системы могут быть использованы как в фундаментальных исследованиях, так в дальнейшем и для лабораторной диагностики заболеваний человека. Содержание работы достаточно полно отражено в 7 опубликованных печатных работах, из которых 3 статьи (2 статьи в рецензируемых научных журналах из перечня ВАК и 1 статья в рецензируемом иностранном журнале) и 4 тезисов в материалах российских конференций.

Критические замечания и вопросы к дискуссии

Текст диссертации И.В. Смирнова не лишен недостатков, которые имеют в основном редакторский характер и не снижают общей высокой оценки работы.

К замечаниям филологического плана можно отнести разностильность написания текста - использование безличной возвратной формы глаголов в одних разделах и личной формы в прошедшем времени - в других. В тексте имеются синтаксические и орфографические опечатки, а также неудачные выражения.

Заключение

Диссертационное исследование И.В. Смирнова «Создание и характеристика моноклональных антител к эндоглину, маркеру мезенхимных стволовых клеток и эндотелия», является завершенной квалификационной работой, содержит новые научные данные, представляющие интерес для клеточной биологии, физиологии, иммунологии и

лабораторной диагностики и отвечает требованиям ВАК, содержащимся в «Положении о порядке присуждения ученых степеней», утвержденном постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология».

Ведущий научный сотрудник
лаборатории клеточных культур
ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа»
Министерства Здравоохранения РФ
кандидат биологических наук
Смирнова Татьяна Дмитриевна
ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа»
Министерства Здравоохранения РФ
г. Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, 15/17
тел. (812)499-15-30, cellcultures@influenza.spb.ru



Смирнова Т.Д.
26.12.2016

