

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУ «НИИ онкологии

им. Н.Н. Петрова» Минздрава России

Доктор медицинских наук, профессор

 А.М. Беляев

« 16 » марта 2017 года



ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательского института онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации на диссертационную работу Смирнова Ильи Валерьевича на тему: «Создание и характеристика моноклональных антител к эндоглину, маркеру мезенхимных стволовых клеток и эндотелия», представленную к защите в совет по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.230.01 при ФГБУ «Институт цитологии» РАН на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Актуальность темы диссертации

Последние годы в молекулярной и клеточной биологии наблюдается интенсивный прогресс, связанный с революционными открытиями, касающимися ключевых моментов генной и клеточной регуляции, в том числе затрагивающих механизмы клеточной пролиферации, миграции, адгезии, взаимодействия и взаимовлияния клеток различных тканей организма, что особенно важно в свете поиска подходов к терапии различных заболеваний.

Диссертационное исследование И.В. Смирнова посвящено изучению эндоглина, являющегося компонентом рецепторных комплексов к факторам из семейств трансформирующего фактора роста бета (TGFβ), костных морфогенетических белков (BMPs) и активина, созданию и подробной характеристике моноклональных антител (МКАТ), специфичных к этому гликопротеину, которые по их свойствам, как следует из представленной работы, намного превосходят их зарубежные аналоги. На сегодняшний день не представляет сомнений существенная роль эндоглина и цитокинов суперсемейства TGF-β в регуляции процессов ангиогенеза в эмбриональных и взрослых тканях, неоангиогенеза и опухолевого метастазирования. Появляются данные о его участии в дифференциации клеток иммунной системы, в регуляции жизнедеятельности мезенхимальных стволовых клеток, гладкомышечных клеток и трофобласта. МКАТ к эндоглину могут быть использованы не только для прикладных и фундаментальных исследований, но и для разработки способов

медицинской диагностики и анти-ангиогенной терапии, а также таргетной терапии в онкологии. Таким образом, создание нового инструмента, каким является полученное автором семейство МКАТ, распознающих мембранную и растворимую формы эндоглина, позволяет совершенствовать методы его идентификации, количественного измерения и качественного анализа в различных биологических жидкостях и на мембранах различных клеток, что определяет актуальность выбранной темы диссертационной работы. В задачи работы входило получение, характеристика препаратов рекомбинантных молекул эндоглина и исследование их иммуногенности на мышах; создание на основе активированных лимфоцитов мышей семейства гибридом-продуцентов МКАТ к эндоглину; исследование иммунохимических свойств полученных реагентов и определение областей их применения; создание двухцентровой системы иммуноферментного анализа (ИФА) для количественного определения растворимой формы эндоглина; исследование и исследование возможности полученных реагентов как инструментов для изучения роли эндоглина в биологии клеток. Выполнение поставленных научных задач явилось своевременным и актуальным.

Научная новизна

Выполненная работа является комплексным, многофакторным исследованием, которая позволила создать на основе современных высокотехнологичных методик, благодаря использованию в качестве доноров иммунных спленоцитов мышей F1(SJL/JxBALB/c), новый репертуар МКАТ к эндоглину, что дало возможность сконструировать двухцентровую систему ИФА с высокой чувствительностью к молекулам растворимого эндоглина. Данная система выявляет в среднем на два порядка большие уровни эндоглина в плазме крови человека, чем коммерческие аналоги, что позволило получить новые научные данные, касающиеся концентрации растворимого эндоглина в кровотоке, гетерогенности молекулы эндоглина, находящейся в периферической крови и культуральной жидкости эндотелиоцитов человека. Данные денситометрического анализа свидетельствуют о том, что значения концентрации эндоглина, полученные в системе антител 4E4-4C9, существенно ближе к истинному содержанию антигена, чем величины, определенные в коммерческом наборе.

Научно-практическая значимость

Проведённое исследование позволило научно обосновать возможность и необходимость пересмотра существующих представлений об уровне растворимого эндоглина в плазме крови человека.

Практическая значимость работы заключается 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. Ее качественные характеристики превосходят параметры широко применяемого коммерческого аналога. Созданные реагенты и тест-системы могут быть использованы в прикладных и фундаментальных исследованиях.

Достоверность и обоснованность

Цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, сформулированы ясно и убедительно. Для получения рекомбинантных молекул эндоглина автор использовал методы очистки и визуализации нуклеиновых кислот, клонирования фрагментов кДНК эндоглина в векторные конструкции, культивирования и электротрансформации клеток *E.coli*, экспрессии и очистки синтезированных молекул эндоглина. Далее материалом для исследования служили мыши ♀F1(SJL/JxBALB/c), которые были подвергнуты иммунизации полученными рекомбинантными молекулами эндоглина. После создания гибридом и получения МКАТ к эндоглину, автор осуществил получение молекул эндоглина, меченных биотином и конъюгированных с пероксидазой хрена, разработал методы ИФА, вестерн-блот, что позволило выявлять эндоглин в биологических жидкостях, на гистологических срезах, в клеточных мазках, а также на клетках методом проточной цитофлуорометрии. Здесь материалом служили полученные из жировой ткани человека культуры МСК, а также перевиваемые опухолевые клеточные линии, предоставленные из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ.

Значительный объем данных, полученный при непосредственном участии автора, который позволил адекватно использовать соответствующие задачам статистические методы, убеждает в обоснованности и достоверности полученных результатов.

Оценка содержания работы

Диссертация написана согласно современным требованиям и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы по результатам собственных исследований, обсуждения, выводов и списка литературы. Данные исследования изложены на 161 страницах текста. Работа содержит 10 таблиц и 40

рисунков. Список литературы включает 383 источника, в том числе 6 отечественных и 377 иностранных авторов.

Во введении автор детально определяет актуальность исследования, формулирует цель и задачи, научную новизну и практическую значимость, представляет результаты апробации работы, личный вклад автора, а также положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор (глава 1) выдержан в стиле монографии, в нем приводятся подробные сведения, касающиеся существующих на текущий момент данных о строении и функциях эндоглина, его роли в эмбриональном развитии, при различных патологиях человека, и всесторонний анализ современного состояния проблемы, связанной с созданием инструментов детекции и мониторинга этой молекулы, позволяющих осуществлять разнообразные иммунохимические исследования. Обзор прекрасно иллюстрирован, таблицы, представленные в обзоре, демонстрируют глубокую проработку автором всех имеющихся источников литературы. Литературные данные описаны хорошим языком и позволяют определить место и значение предпринятого исследования в системе существующих научных положений, но следует отметить, что объем литературного обзора явно завышен, составляя более 30% текста всей диссертации, и содержит сведения, не касающиеся непосредственно темы диссертации.

Во второй главе, «Материалы и методы» (17 стр.), подробно описаны методы, которые автор диссертационного исследования использовал для получения рекомбинантных молекул эндоглина, иммунизации мышей, создания гибридом-продуцентов МКАТ к эндоглину, для выявления молекул эндоглина в различных биологических жидкостях, на тканевых срезах и клеточных препаратах, для оценки жизнеспособности клеток. Также представлены методы визуализации и статистической обработки данных. Несколько трудно понять из текста с каким материалом работал автор, так как собственно описание объектов, служащих «материалом» исследования, не выделено в отдельный подраздел. Использование диссертантом многих молекулярно-биологических, цитологических и морфологических методов свидетельствует о его высокой квалификации как экспериментатора. Объем изученного материала и избранные методы статистического анализа не вызывают сомнений в значимости и достоверности полученных результатов.

Третья глава занимает 38 стр. и посвящена результатам собственных исследований. Автором была проведена работа по синтезу рекомбинантных молекул эндоглина, которые обладали высокой иммуногенностью для мышей F1(SJL/JxBALB/c), причем было установлено, что только пептиды, полученные из клеток млекопитающих, индуцируют продукцию антител, взаимодействующих с мембранной формой антигена. В

работе подробно охарактеризованы 12 штаммов гибридом-продуцентов МКАТ к эндоглину человека, созданных на основе иммунных спленоцитов мышей F1(SJL/JxBALB/c), два из которых были запатентованы (патент № 2604192 и приоритетная справка № 2015145138 от 20.10.2015). Были исследованы иммунохимические свойства полученных МКАТ, которые распознают десять конформационных и два линейных эпитопа эндоглина человека, причем пять реагентов распознают на молекуле антигена пространственно изолированные детерминанты, а семь антител связывают частично перекрывающиеся эпитопы. На основе пар МКАТ, которые были специфичны к пространственно разобщенным детерминантам, были созданы двухцентровые системы ИФА, основанные на различных сочетаниях иммобилизованных и меченных ферментом МКАТ и выявляющие разные концентрации растворимого эндоглина. Система на основе запатентованных реагентов 4E4 и 4C9 была способна определять уровни антигена, которые в среднем на два порядка превышают значения, полученные с помощью аналогичного коммерческого набора. В диссертационном исследовании автором были продемонстрированы возможности созданных МКАТ к эндоглину в качестве инструментов для изучения биологии клеток, что позволило установить, что экспрессия молекул CD105 на мембране клеток лабильна и может изменяться в зависимости от условий культивирования. Созданные МКАТ к эндоглину позволили исследовать концентрации этой молекулы в супернатантах клеточных культур, провести процедуры иммунопреципитации для очищения молекул эндоглина и выделить эндоглин с различным молекулярным весом с помощью вестерн-блота. Это позволило провести сравнительный качественный и количественный анализ обновления рецепторов на мембранах изучаемых клеток. Проведенные исследования привели к заключению, что полученные реагенты дают возможность проводить разностороннее изучение роли эндоглина в биологии клеток, могут быть использованы для выявления изменений в уровнях экспрессии эндоглина и изучения процесса их обновления на мембранах клеток. Все полученные данные проиллюстрированы рисунками высокого качества.

Таким образом, автором убедительно показано, что созданная панель МКАТ обеспечивает в фундаментальных и прикладных исследованиях иммуноаффинное выделение молекул растворимого эндоглина, их детекцию методом вестерн-блота и двухцентрового иммуноанализа, а также выявление CD105 на мембранах клеток с помощью методов проточной цитофлуориметрии, иммунофлуоресценции и иммуногистохимии.

В четвёртой главе (9 стр.) автором проводится обсуждение полученных результатов исследования, где имеет место подробный сравнительный анализ всей

совокупности данных, имеющихся в мировой и отечественной литературе, и детальное обсуждение результатов, что дает основания для формирования полноценных выводов.

Выводы целиком вытекают из результатов исследования.

Автореферат и 8 публикаций, в том числе 2 в отечественных журналах, рекомендованных ВАК и одна - в рецензируемом иностранном журнале, полно отражают результаты исследования.

Внедрение результатов исследования

Результаты, полученные в диссертационном исследовании, запатентованы (патент на изобретение № 2604192 от 20.10.2015 и заявка на изобретение № 2015145138 от 20.10.2015, положительное решение), и разработанные методики внедрены в лаборатории гибридной технологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в отделе внутриклеточной сигнализации и транспорта Федерального государственного бюджетного учреждения «Институт цитологии Российской академии наук».

Рекомендации по дальнейшему внедрению

Результаты данного диссертационного исследования могут быть рекомендованы для внедрения в экспериментальную и клинично-экспериментальную работу научно-исследовательских академических и медицинских учреждений. Полученные МКАТ могут служить основой для разработки подходов анти-ангиогенной и таргетной терапии, в том числе в лечении злокачественных новообразований.

Замечания. Кроме небольших замечаний, касающихся стиля оформления диссертации, указанных выше, которые несколько не влияют на высокую положительную оценку данной работы, других принципиально важных замечаний нет.

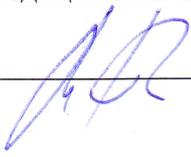
Заключение

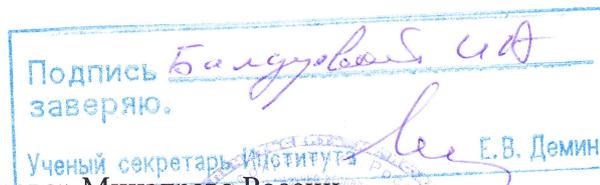
Диссертация Смирнова Ильи Валерьевича «Создание и характеристика моноклональных антител к эндоглину, маркеру мезенхимных стволовых клеток и эндотелия», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельной законченной квалификационной научно-исследовательской работой, в которой содержится решение важной и актуальной задачи – создания и характеристики нового семейства МКАТ, распознающих мембранную и растворимую формы эндоглина. Выводы и рекомендации достаточно обоснованы. По совокупности

критериев работа полностью соответствует требованиям п.9 «Положения ВАК МО РФ о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Отзыв заслушан и обсужден на заседании Научного отдела онкоиммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол №1 от «22» февраля 2017 г.

Заведующий научным отделом
онкоиммунологии
Федерального государственного
бюджетного учреждения
«Научно-исследовательский институт
онкологии им. Н.Н. Петрова»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
доктор медицинских наук


И.А.Балдуева



ФБГУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России
Адрес: Россия, 197758, Санкт-Петербург
пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68
тел.: (812)596-8655
эл.адрес oncl@rion.spb.ru

