

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу
Студенникова Артема Евгеньевича

«Антитела к полициклическим ароматическим углеводородам и
антиидиотипические антитела к ним: получение, характеристика, применение»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.3 – молекулярная биология

Актуальность темы исследования. Зафиксированная многочисленными санитарно-гигиеническими исследованиями глобальная общемировая тенденция к росту распространенности в окружающей среде полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), в том числе, ключевого индикатора их присутствия бензо[а]пирена (БП), выдвигает на передний план вопросы, связанные с эффектами воздействия ПАУ на организм человека и с поиском методов их идентификации. Именно в данном ключе реализован исследовательский подход в диссертации Студенникова А.Е. Отмечу, что особую актуальность результатам осуществленного исследования придает попытка тестирования возможностей практического внедрения результатов НИР через оценку перспектив применения, полученных в ходе исследования идиотипических антител (иАТ) к БП и антиидиотипических антител (аиАТ) для оценки подверженности организма человека такому социально значимому заболеванию как рак легкого. Использование самых передовых методов молекулярной иммунологии и генетической инженерии позволило Студенникову А.Е. решить поставленные в диссертации задачи и наметить пути для проведения дальнейших исследований в данной области.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна. В ходе выполнения диссертационного исследования Студенниковым А.Е. были сформулированы научные положения и выводы, основанные на остаточном объеме фактического материала с применением адекватных целям и задачам исследования методов и математического аппарата. Достоверность результатов исследования сомнений не вызывает.

Научная новизна работы. Все представленные в работе результаты обладают научной новизной и фундаментальностью, так как направлены на получение новых научных данных об особенностях образования и структуры АТ против ПАУ, в том числе с учетом их роли в развитии и прогрессировании онкологических заболеваний (рак легкого). Студенников А.Е. в ходе реализации целей и решения задач диссертационного исследования получил и охарактеризовал человеческие одноцепочечные иАТ против БП и аиАТ, которые оказались уникальными по структуре – аминокислотные последовательности, образующие переменные домены Н- и L-цепей, и их характеристики, ранее не были опубликованы и описаны.

Значимость выводов и результатов, полученных в диссертации для науки и практики. Выполненное Студенниковым А.Е. диссертационное исследование помимо безусловной фундаментальной значимости – получение новых научных данных о структуре идиотипических антител к бензо[а]пирену и направленных против них антиидиотипических антител, имеет выраженную практическую направленность. Последняя, по моему мнению, на данном этапе исследования, прежде всего связана с уточнением и детализацией протокола работ по получению иАТ и аиАТ, что обладает

самостоятельной ценностью и безусловно является сильной стороной данной работы. Кроме того, по результатам своего исследования Студенников А.Е. анализирует разработанный им алгоритм иммуноанализа АТ против БП в сыворотке крови человека с позиций перспектив использования в диагностике вероятности возникновения РЛ.

Общая характеристика диссертационной работы. Диссертационная работа Студенникова А.Е. написана качественным научным и литературным языком. Состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов, Обсуждения результатов, Заключение, Выводов, Списка литературы и Списка сокращений.

Обзор литературы логично структурирован. Основную часть, посвященную антителам к ПАУ и функциональной роли антиидиотипических антител, предваряет характеристика химического канцерогена, вызываемого полициклическими ароматическими углеводородами, и краткая физико-химическая характеристика ПАУ. Обсуждая данные литературы Студенников А.Е. отмечает, что комплексы ПАУ с макромолекулярными носителями (ДНК и белки) симулируют синтез специфических антител различных классов. Делает заключение о том, что эффекты торможения или развития канцерогенеза, зафиксированные в экспериментах на животных моделях, позволяют предположить, что у человека АТ против БП могут разную роль – как протективную, так и этиологическую – способствовать развитию заболеваний онкологического профиля. Указывает, что одной из причин разнонаправленного действия АТ против БП может быть наличие аиАТ и отмечает недостаточную изученность их роли в химическом канцерогенезе, а также перспективность в системах иммуноанализа при работе с потенциально опасными антигенами.

В главе «Материалы и методы» автором диссертации дано описание изучаемого объекта и методов исследования: перечисляются используемые реактивы (наборы и химические вещества), бактериальные штаммы *Escherichia coli* и среды для их культивирования; дается краткая характеристика методов приготовления конъюгата бензо[а]пирен-БСА, амплификации комбинаторной библиотеки одноцепочечных антител человека, аффинной селекции бактериофагов, отбора фаговых антител, выделения плазмидной и фагмидной ДНК из *Escherichia coli*, постановки ПЦР плазмидной и фагмидной ДНК, секвенирования плазмидной и фагмидной ДНК, совокупность действий по конструированию векторов, трансфекции бактериальных клеток, выделению и очистке полученных антител, содержащих целлюлозосвязывающий домен, с помощью аффинной хроматографии на аморфной целлюлозе и так далее. В целом данный раздел позволяет получить достаточно полное представление о методологических и методических приемах, использованных автором диссертационного исследования.

В главе «Результаты» Студенников А.Е. поэтапно, согласно логике работы, приводит полученные в ходе выполнения диссертационного исследования результаты, включая фиксацию ключевых эпизодов: скрининга фаговой библиотеки одноцепочечных антител человека (в 15 из 26 бактериальных клонов, продуцирующих иАТ, и в 12 из 24 бактериальных клонов, продуцирующих аиАТ, присутствовали ДНК-фрагменты нужной длины, около 750 п.о.); анализа нуклеотидной и аминокислотной последовательностей отобранных антител (6 из 27 бактериальных клонов, продуцирующих полноценные одноцепочечные АТ, кодировали уникальные одноцепочечные АТ: Т68, Т72, Т77 – иАТ; А4, В4, В5 – аиАТ, исследование нуклеотидных последовательностей которых с использованием базы данных IMGT показал, что V сегменты H-цепей принадлежали к пяти различным группам внутри двух семейств (IGHV1 и IGHV3); D-сегменты H-цепей – к трем

семействам (IGHD2, IGH3 и IGH4); J-сегменты H-цепей к четырем семействам (IGH1, IGH3, IGH4 и IGH6; что касается V сегментов L-цепей, то они относились к каппа-типу (IGKV1 и IGKV3), а J-сегменты L-цепей к семействам (IGK1, IGK2 и IGK4), далее для оценки воздействия БП на созревание вариабельных доменов, отобранных АТ было проанализировано потенциальное селективное давление антигена с использованием полиномиальной и фокусированной биномиальной модели; получения бактериальных штаммов-продуцентов иАТ Т72 и аиАТ А4, выделения и очистки АТ (электрофоретическая подвижность иАТ Т72-ЦСД и аиАТ А4-ЦСД была около 45 кДа, что соответствовало теоретически предсказанным молекулярным весам); иммунохимической характеристики отобранных одноцепочечных антител – иАТ Т72 и аиАТ А4 (АТ А4 являются аиАТ и взаимодействуют с антигенсвязывающим доменом как иАТ Т72, так и иАТ рSh; равновесные K_D для аиАТ А4 и иАТ рSh, аиАТ А4 и иАТ Т72 составили $0,77 \times 10^{-8}$ М и $5,71 \times 10^{-7}$ М); подбора условий для определения эндогенных иАТ и аиАТ к бензо[а]пирену в сыворотках крови человека методом ИФА (оптимальные условия сорбции для А4, Т72 и рSh – при 37°C в течение часа, для БП-БСА – 12 часов при комнатной температуре); сравнения связывания иАТ и аиАТ к полициклическим ароматическим углеводородам из сывороток крови человека с бензо[а]пиреном, А4, Т72 и рSh (ответ сывороток на БП и А4 имеет линейную зависимость, аналогичная зависимость наблюдается и для пары Т72-рSh); определения уровней эндогенных идиотипических и антиидиотипических АТ против бензо[а]пирен в крови больных раком легкого и здоровых доноров (уровни иАТ и аиАТ в сыворотке крови достоверно ($p < 0,05$) отличаются между группами здоровых и больных РЛ, проверка корреляций показала, что уровень аиАТ коррелирует с возрастом ($\rho = 0,34$) и с наличием заболевания ($\rho = 0,44$)).

В главе «Результаты и обсуждение» Студенников А.Е. анализирует, систематизирует, обобщает и интерпретирует полученные результаты. В том числе, доказывает уникальность структуры полученных АТ и указывает, что полученная в данной работе модель логистической регрессии свидетельствует в пользу перспективности применения результатов, полученных в диссертационном исследовании для определения риска заболевания РЛ, а также выявления групп риска среди практически здоровых людей.

В главе «Заключение» коротко суммируются полученные данные и подводятся итоги исследования, нашедшие отражение в выводах, раскрывающих заявленную в работе цель и позволяющие утверждать, что задачи, которые Артем Евгеньевич поставил перед собой – полностью решены.

Материал диссертации изложен на 112 страницах. Список цитированной литературы включает 214 источников, из них 11 отечественных. Работа иллюстрирована цифровыми и графическими материалами – содержит 9 таблиц и 16 рисунков.

Достоверность результатов и обоснованность выводов. Убедительность, достоверность и обоснованность выводов диссертации обеспечивается четкой продуманностью дизайна исследования, применением обоснованного методологического подхода и адекватного целям исследования математического аппарата. Работа отличается адекватностью использованных методов и подходов, корректной интерпретацией результатов исследования, проработанностью полученных выводов, полностью отвечающих цели и задачам исследования.

Значимость работы. В целом, выполненное Студенниковым А.Е. исследование значительно расширяет современные представления о молекулярных механизмах антителообразования к ПАУ и возможностях генно-инженерных манипуляций с целью

получения человеческих белков. Таким образом, к возможным областям практического использования результатов диссертационного исследования можно отнести молекулярную иммунологию, онкологию, биотехнологию и геномную медицину.

Сведения о полноте опубликованных научных работ. Материалы диссертационной работы прекрасно обсуждены – доложены на 18 научных конференциях. По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, в журналах, индексируемых в базах Web of Science или Scopus. Получено два патента на изобретение.

Общие вопросы и замечания по работе. Отмечая несомненную фундаментальную и прикладную ценность работы, можно сделать некоторые замечания, безусловно, не снижающие ценности полученных автором диссертационного исследования результатов. Есть определенная небрежность в оформлении как самой диссертации, так и автореферата диссертации – опечатки, стилистические погрешности, «съезжающая» таблица 2.

1. Вызывает определенное недоумение и вопросы целесообразность избыточной нумерации мелких пунктов и подпунктов диссертации. Наиболее ярко эта особенность оформления работы проявляется в главе Материалы и методы. Так, например, раздел Материалы, изложенный на 3 страницах, включает 6 подглав (2.1.1.-2.1.6), а раздел Методы (12 страниц текста) – 23 (2.2.1.-2.2.23).
2. В заключении к главе 1 автор резюмирует «Из представленных в литературном обзоре данных следует, что в развитии РЛ участвуют многие факторы, и не последнюю роль в его образовании играют вещества группы ПАУ». При этом в самой главе проблема рака легкого не обсуждается, а рассматриваются общие аспекты химического канцерогенеза, вызываемого полициклическими ароматическими углеводородами, который, несомненно, играет ведущую роль в этиологии и патогенезе рака легкого.
3. «Бросается в глаза» противоречие в описании результатов анализа в части нормальности распределения в группах сравнения. Так, на стр. 74 автор пишет: «данные ИФА для группы здоровых людей **не имели нормальное распределение**, а для группы больных РЛ людей распределение было нормальным». На стр. 80 указано прямо противоположное: «Данные ИФА группы здоровых людей **имели нормальное распределение**, в отличие от пациентов с заболеванием рака легкого, которые имели ненормальное распределение».

В процессе ознакомления с диссертационной работой Студенникова А.Е. возникло несколько вопросов.

1. Во Введении автор диссертационного исследования указывает, что «С помощью полученных человеческих АТ разработан новый метод иммуноферментного анализа для определения эндогенных иАТ к ПАУ и аиАТ в сыворотке крови человека». Хотелось бы уточнить, какие именно подходы и приемы позволяют утверждать, что использованный в работе ИФА – это принципиально новый метод, а не модификация существующих разработок?
2. Какие конкретно варианты молекулярно-генетических методов исследования были применены при секвенировании плазмидной и фагмидной ДНК и при постановке ПЦР для анализа полученных в работе плазмидных конструкций? В методах исследования и в обсуждении результатов это не указывается.
3. Каковы показатели среднего возраста и пределы варьирования данного показателя в исследованных группах больных раком легкого и группе сравнения?

Собирались ли и анализировались анамнестические данные в отношении группы сравнения?

Заключение. Диссертационная работа Студенникова Артема Евгеньевича на тему «Получение и характеристика идиотипических антител против полициклических ароматических углеводов и антиидиотипических антител, содержащих внутренний образ бензо[а]пирена. Использование полученных антител в диагностике рака легкого», выполненная под руководством кандидата биологических наук Устинова Валентина Анатольевича представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится новое решение актуальной научной задачи, имеющей важное значение для молекулярной иммунологии, биотехнологии и персонализированной медицины, так как работа посвящена получению иАТ и аиАТ – человеческих одноцепочечных антител к ПАУ, а также изучению с гуморальных реакций больных РЛ в сравнении со здоровыми людьми.

Диссертационная работа Студенникова Артема Евгеньевича на тему «Получение и характеристика идиотипических антител против полициклических ароматических углеводов и антиидиотипических антител, содержащих внутренний образ бензо[а]пирена. Использование полученных антител в диагностике рака легкого» полностью соответствует требованиям, установленным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Официальный оппонент

доктор биологических наук, доцент,
профессор кафедры микробиологии, иммунологии
и вирусологии ФГБОУ ВПО «Кемеровский
государственный медицинский университет»
МИНЗДРАВА РФ
650056, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а
(3842) 734856
e-mail: lmb2001@mail.ru
м.т. +79059609447



Лавряшина
Мария Борисовна

31.10.2022

Подпись заверяет

Ведущий специалист
по кадрам *М.Т. Сушиков*