

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента на диссертационную работу Хасбиуллиной Наили Рамилевны «Репертуар антигликановых антител человека в первые месяцы жизни», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.**

В последние годы интенсивное изучение гуморального иммунитета позволило получить экспериментальное подтверждение гипотезы о многообразии физиологических функций естественных антител (Е-АТ). Доказано, что эти АТ на молекулярном уровне регулируют координацию различных процессов, происходящих в организме, путем взаимодействия с соответствующими антигенами. По научным данным ряда исследователей в обеспечении нормальной жизнедеятельности организма важная физиологическая роль принадлежит, именно, естественным антителам, направленным к гликанам – компонентам гликолипидов, гликопротеинов и полисахаридов. Однако, на сегодняшний день в малой степени проведено систематическое исследование репертуара и эпитопной специфичности анти-гликановых антител, а также их участия в развитии иммунной системы и выявлении функциональных мишеней. Наиболее известные научные работы в области изучения естественных антител описывают иммунный ответ на антигены пептидной природы, а объектом исследования, как правило, являются группы взрослых здоровых доноров и лиц, имеющих какие-либо патологии. Научные исследования в этой области продолжаются.

Подтверждением тому служит диссертационная работа Хасбиуллиной Н.Р., направленная на изучение репертуара естественных антител к гликанам. Эти молекулы наряду с белками и липидами составляют основу микробных и собственных клеток организма. В раннем возрасте, начиная с момента рождения, полости тела человека начинают колонизироваться микроорганизмами, которые в дальнейшем и будут составлять основу микрофлоры. Период времени, когда новорожденный переходит от практически стерильных условий внутриутробного развития, к богатой антигенами окружающей среде, представляет большой интерес для изучения процессов становления иммунной системы. Отсутствие детальных исследований в области изучения антигликановых антител в раннем возрасте, делает диссертационную работу Н.Р. Хасбиуллиной весьма значимой и актуальной. Использованные диссертантом подходы в решении поставленных задач интересны и заслуживают внимания. Изучение структурных особенностей антигликановых антител, участвующих в становлении иммунитета, их разнообразия и специфичности, является крайне важной задачей, приобретающей особый диагностический смысл. Полученные при исследовании параметры могут позволить в дальнейшем разграничить два состояния - нормы и патологии.

Выбор гликанов в качестве антигенов обоснован в первую очередь тем, что это группа, в отличие от более изученных антигенов белковой природы, относится в основной своей массе к Т-независимым антигенам, т.е. иммунный ответ на гликаны отличается от ответа на пептиды. Вторая причина - обилие гликанов в составе клеточной стенки бактерий, которые, заселяя отделы кишечника, формируют устойчивое микробное сообщество - микрофлору и стимулируют развитие ассоциированной с кишечником лимфоидной ткани. Так, известны выделяемые некоторыми бактериями факторы, влияющие на эпителий кишечника. Также установлено, что в ответ на колонизацию бактериями, состав продуцируемых эпителием муцинов меняется. Иными словами, доказана связь между микрофлорой и клетками организма млекопитающих и человека. Однако, крайне мало сведений о гуморальном ответе на бактериальную колонизацию происходящую в раннем возрасте.

Основным объектом представленного исследования являлись сыворотка крови детей в раннем возрасте, их матерей, женщин с нормально и патологически протекающей беременностью. В качестве модельного эксперимента использовали группы мышей-гнотобиотов, которых подвергли определенному воздействию. Полученные результаты работы, основанные на обширном экспериментальном материале с использованием статистических подходов, носят значимость фундаментального исследования, а также имеют практическую ценность.

Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов исследования (глава 2), результатов исследования и их обсуждения (глава 3), выводов и списка используемой литературы, содержащего 472 источника. Диссертация представляет собой целостный труд, отдельные разделы которого логически связаны воедино. Объем работы включает 166 страниц и содержит 12 рисунков и 17 таблиц.

Обзор литературы занимает 37 страниц является хорошим введением к изложению собственных результатов соискателя и содержит необходимую для интерпретации полученных данных информацию. Он состоит из двух частей. В первой, уделено большое внимание описанию исследований по естественным антигенам, направленным к гликановым антигенам. Они являются частью системы врожденного иммунитета. Антигены выполняют ряд функций, включая защитную, надзорную и регуляторную. Во второй части рассматривается онтогенез иммунной системы и роль основных факторов, влияющих на становление иммунитета. Литературный обзор, построен логично, органически связан с темой диссертационной работы. Подавляющая часть цитированной литературы датируется последними 5-8 годами. Анализ данных научной литературы позволяет автору обосновать стратегию исследования в соответствии с поставленными задачами. В целом обзор литературы дает подробное представление о предмете

исследования. Диссертант демонстрирует хорошее знание современного состояния дел в области изучения естественных антигликановых антител и онтогенезе иммунной системы, способность к квалифицированному обсуждению литературных данных, обоснованию задач исследования.

Глава 2 «Материалы и методы» хорошо структурирован и содержит всю необходимую информацию об использованных реактивах, образцах сыворотки крови человека и животных. Подробно описана методика работы с гликочипом и статистический подход к обработке полученных данных. Отдельного внимания заслуживает применения метода на основе гликочипа, который является современным, позволяет анализировать небольшие по объему образцы сыворотки крови, имеет широкий динамический диапазон оценки сигналов и позволяет одновременно получать информацию по нескольким сотням гликанов. Используемые в работе методы обеспечивают возможность адекватного решения всех поставленных задач и свидетельствует о хорошей квалификации диссертанта. Четкое и подробное изложение методик позволяет в полной мере анализировать и воспроизводить результаты.

В главе 3 «Результаты и их обсуждение» представлен подробный анализ и обоснование результатов, полученных на каждом этапе работы. Их можно разделить на 4 части. Первая часть представляет результаты исследования сывороток крови мышей-гнотобиотов, включает оценку роли фактора микрофлоры в процесс формирования репертуара антигликановых антител. Во второй части главы 3 приведены результаты сравнительного исследования сыворотки крови новорожденных, их матерей и пуповинной крови. Диссертантом установлен избирательный характер передачи IgG от матери к плоду. Подробно описаны полученные результаты сравнительного анализа сыворотки крови детей в возрасте 3, 6 и 12 месяцев, их матерей и здоровых доноров, используемых в качестве контрольной группы. Особо важным разделом исследования является оценка роли фактора питания в процессе становления иммунной системы детей. Диссертантом выявлены существенные качественные и количественные различия в уровнях антигликановых антител для детей, получавших питание, отличающиеся по составу входящих компонентов. Третья часть главы «Результаты и их обсуждение» посвящена описанию работы, направленной на улучшение имеющейся методики печати гликочипов. Диссертантом обосновано применение гликочипа в качестве основного инструмента исследования для выявления в сыворотке крови специфических антител. Установлены преимущества метода в сравнении с широко распространенным ИФА, имеющим аналогичное назначение. Первое, было показана возможность иммобилизации на поверхности гликочипа более 400 антигенов. Это дало возможность проанализировать антитела в небольшом количестве образца, что особенно важно при работе с сыворотками крови мелких животных и детей в раннем возрасте. Определение специфичности антител,

направленных к 400 антигенам, с помощью метода ИФА потребовало бы в сотни раз большего объема образца крови донора. В реальной медицинской практике это не только не оправдано, но иногда просто невозможно. В результате проведенного исследования предложен более совершенный метод иммобилизации гликанов на активированной поверхности гликоципа. Новый способ посадки антигенов позволяет улучшать качество анализа и достоверность результатов. Кроме того, диссертантом показано, что наряду с исследованиями, направленными на решение фундаментальных задач, гликоцип применим и для практических целей. С его помощью удобно проводить скрининговый анализ репертуаров антител многочисленных групп доноров с целью поиска диагностически значимых иммунологических маркеров. Применение единой платформы для анализа позволяет получать единообразные данные и с большей статистической точностью обрабатывать полученные результаты. В четвертой части предложена технология использования «сконструированного» гликоципа. Получены результаты, показывающие практическую значимость применения гликоципа, как основы диагностики акушерских патологий для выявления диагностически значимых антигликановых антител. Обсуждение результатов каждой части данной главы облегчает восприятие обширного экспериментального материала и представить общую картину всей работы.

Диссертантом выполнено глубокое многоэтапное исследование, которое отличает новизна постановки эксперимента, умение найти практическое использование полученных результатов работы. Обращает на себя внимание тщательность постановки контрольных экспериментов во всех разделах работы и большой иллюстративный материал. В заключении диссертант, суммируя и анализируя полученные результаты, четко формулирует выводы, которые отражают новизну и практическую значимость работы и полностью соответствуют результатам исследования. Достоверность полученных данных обеспечена большим количеством проведенных экспериментов и хорошей статистикой. Научные результаты являются новыми и могут быть использованы для выполнения биохимических и биомедицинских исследований

Основной материал диссертации опубликован в 7 статьях в ответственных и зарубежных журналах и докладывался автором на 10 всероссийских и международных конференциях.

Автореферат и опубликованные работы полностью отражают содержание диссертации.

У оппонента нет серьезных замечаний ни по постановке эксперимента, ни по интерпретации результатов. Можно отметить наличие некоторых опечаток и неточно сформулированных фраз и терминов в тексте диссертации и автореферате. Таблицу №4 в разделе "Материалы и методы", в которой перечислены использованные в работе реактивы, было бы целесообразно представить в виде

текста с более подробным описанием. Например, использованных лектинов, с расшифровкой их сокращенных названий. Также, при описании источников сыворотки крови животных и людей выбран слишком мелкий шрифт, и данные представлены в виде сносок к основному тексту, что затрудняет чтение.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Хасбиуллиной Наиля Рамилевны «Репертуар антигликановых антител человека в первые месяцы жизни» является законченным квалификационным исследованием и по содержанию полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 с изменениями от 21.04.2016, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Хасбиуллина Наиля Рамилевна, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.04 – Биохимия.

#### **Мягкова Марина Александровна**

доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией иммунохимии физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН)

Адрес: 142432, Московская область, Ногинский р-н, г. Черноголовка, Северный пр-д, д.1.

Телефон: +7(496)524-25-46

E-mail: m.a.myagkova@gmail.com



08 мая 2019 г.

Подпись д.б.н., профессора М.А. Мягковой заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН)



Т.Н. Великохатко

Телефон: +7(496)524–2546

Эл. почта: ipas@ipas.ac.ru