

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу **Белогурова Алексея Анатольевича** «Биохимические основы аутоиммунной нейродегенерации», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия

Представленная к защите работа Белогурова А.А. посвящена не только изучению этиологии и патогенеза аутоиммунной нейродегенерации, известной также как рассеянный склероз, но и разработке инновационных подходов к лечению. Автор провел целый комплекс исследований на основе современной биорганической химии и иммунологии, направленных на поиск этиологии и молекулярных механизмов патогенеза, ответственных за возникновение и прогрессирующее развитие аутоиммунной нейродегенерации. Эти данные позволили диссертанту создать лекарственное средство *Xemys*, которое успешно прошло не только доклинические испытания, но и первые две фазы клинических испытаний. Другими словами, диссертация Белогурова А.А. является прекрасным и редким примером работы, выполненной в соответствии с общей методологией трансляционной медицины – от поиска молекулярных механизмов патологических процессов – мишеней, до их коррекции с помощью инновационных лекарственных средств. При этом был успешно использован важнейший инструмент трансляционной медицины – сочетание и взаимное дополнение клинического и экспериментального подходов.

Основные направления исследований, представленные Белогуровым А.А., включают в себя изучение репертуара аутоантител при рассеянном склерозе, доказательство гипотезы о ключевой роли молекулярной мимикрии в этиологии рассеянного склероза, исследование протеасомной деградации одного из главных аутоантигенов при рассеянном склерозе – основного белка миелина, а также создание ряда подходов к специфической терапии рассеянного склероза, включающих в себя бифункциональные иммунотоксины и инкапсулированные фрагменты аутоантигенов.

Работа изложена на 230 страницах и содержит 87 рисунков и 13 таблиц. Она построена по классическому принципу и включает в себя разделы «Введение», «Литературный обзор», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Литературный обзор занимает чуть меньше 1/5 от общего объема диссертации и включает в себя общую информацию о патогенезе рассеянного склероза, подробное описание компонентов врожденного и адаптивного иммунного ответа, задействованных при заболевании, а также проблематику процессинга и презентации аутоантигенов при рассеянном склерозе. Достаточно подробно описано современное состояние экспериментального моделирования рассеянного склероза на различных животных, что очень важно для интерпретации данных, полученных на клиническом материале. Отдельно и очень детально рассмотрены уже существующие и разрабатываемые подходы к лечению рассеянного склероза. Автор уделил особое внимание терапевтическим средствам на основе пептидных фрагментов аутоантигенов. В целом обзор современной литературы демонстрирует уровень сложности материала, с которым столкнулся автор. Количество ссылок 428, подавляющая часть которых относится к работам последнего десятилетия. Раздел «Материалы и

Методы» по объему аналогичен литературному обзору и описывает как стандартные процедуры, использованные при проведении исследований и оценке полученных результатов, так и совершенно новые, в частности позволяющие изучать особенности функционирования убиквитин-протеасомной системы. Раздел «Результаты и обсуждение» составляют основную часть диссертации.

Исследования Белогурова А.А. можно разделить на два направления, которые неразрывно связаны друг с другом. Первое направление посвящено изучению молекулярных основ аутоиммунной нейродегенерации. В данном разделе автор представляет результаты по изучению репертуаров аутореактивных иммуноглобулинов к миелиновым антигенам. Наибольший интерес представляет создание фаг-дисплейной библиотеки одноцепочечных антител на основе лимфоцитов, полученных у пациентов с рассеянным склерозом. Действительно, при этом удалось идентифицировать моноклональные антитела, способные одновременно связывать вирусные и собственные антигены. Кроме того, широкомасштабное секвенирование «предобогатенных» библиотек позволило впервые детерминировать зародышевые линии, характерные для кросс-реактивных антител.

Еще одним важным результатом исследований в рамках первого направления явилось детальное описание механизма убиквитин-независимого гидролиза основного белка миелина протеасомой. Большое количество полученных диссертантом экспериментальных данных позволило сформулировать четкую последовательность событий, приводящих к захвату основных субстратов протеасомой с особым типом регуляторной субчастицы. Дальнейшее развитие это направление получило в виде исследований связи аутоиммунной нейродегенерации и убиквитин-независимого гидролиза основного белка миелина. Автором было показано накопление в центральной нервной системе иммунопротеасом при индукции экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, и обнаружены существенные различия в спектре пептидов, которые образуются при расщеплении основного белка миелина различными типами протеасом. Эти пептиды рассматриваются как мишени для цитотоксического действия лимфоцитов, направленного на уничтожение олигодендроцитов – глиальных клеток, формирующих миелиновую оболочку аксонов.

Исследования диссертанта в рамках второго направления были посвящены разработке инновационных подходов к специфической терапии аутоиммунной нейродегенерации. При этом диссертант, используя фундаментальные знания о молекулярных механизмах патогенеза рассеянного склероза, полученные в рамках первого направления, создал прототипы перспективных лекарственных кандидатов. На первом этапе работы была использована направленная элиминация аутореактивных лимфоцитов с применением бифункциональных иммунотоксинов, состоящих из «направляющего» фрагмента – пептида аутоантигена, связанного с цитотоксином. Далее автор успешно применил селективные ингибиторы иммунопротеасомы в лечении экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, тем самым продемонстрировав их высокий потенциал в качестве потенциальных лекарственных средств для лечения рассеянного склероза. И, наконец, наиболее важным вкладом Белогурова А.А. в данный раздел работы явилось создание липосомальной композиции, содержащей фрагменты основного белка миелина, инкапсулированные в малоразмерные маннозилированные липосомы. Важно отметить, что данный препарат прошел успешно не только

доклинические испытания (на животных), но и две фазы клинических испытаний – на больных.

Из выше изложенного следует, что в диссертационной работе Белогурова А.А. получены новые фундаментальные знания об этиологии и патогенезе рассеянного склероза, на основе которых были предложены инновационные подходы к лечению этого тяжелейшего социально значимого нейродегенеративного заболевания. Однако даже в отношении самых выдающихся исследований могут быть высказаны критические замечания, которые ни в коей степени не умаляют достоинства работы в целом, но могут быть полезны при ее дальнейшем развитии и популяризации.

I. Комментарии к Обзору литературы:

1. В обзоре подчеркивается, что рассеянный склероз – одно из тяжелейших социально значимых нейродегенеративных заболеваний, причем социальная значимость усиливается быстрым ростом числа больных. Хотелось бы знать, какие причины вызывают быстрый рост числа больных.

2. Несмотря на то, что одним из важнейшим итогов патологических процессов при рассеянном склерозе является нейродегенерация, в работе прямо не прописано, что является ее причиной. Так, при прочтении диссертации складывается впечатление, что причиной дегенерации нейронов является механическая потеря миелина, хотя настоящей причиной, вероятно, является секреция лимфоцитами цитокинов воспаления, обладающих нейротоксическим действием.

3. Принципиально важным элементом патогенеза рассеянного склероза является проникновение лимфоцитов из крови через гемато-энцефалический барьер в нервную систему. Диссертант упоминает, что есть несколько стадий проникновения лимфоцитов через гемато-энцефалический барьер, но не уточняет, чем они характеризуются. Это также невозможно понять, глядя на соответствующую схему.

II. Комментарии к разделу Материалы и методы:

1. Фактически отсутствует описание методов оценки поведения животных при экспериментальном моделировании рассеянного склероза.

2. В разделе «Имуногистохимия» описана очень схематично общая процедура иммуногистохимического выявления антигенов, но не написано, какие первичные антитела были использованы. Хотя список антител дается позднее в разделе 3.18 «Химические реактивы...», там тоже не отмечено, какие именно антитела использовали для иммуногистохимии.

3. В разделе «Пациенты с рассеянным склерозом» написано, что для исследования была использована кровь больных с «достоверным диагнозом рассеянного склероза», однако не было указано, какими критериями при этом руководствовались.

III. Комментарии к разделу Результаты и обсуждение:

1. Совмещение Результаты и обсуждения имеет определенные недостатки, т.к. при этом обсуждение в каждом разделе ограничивается в основном только результатами исследований, описанных в данном разделе.

2. В экспериментальных исследованиях поведение животных оценивается визуально – в баллах, хотя уже многие годы для оценки поведения используют объективный автоматизированный анализ.

3. Как и в случае поведения, в морфологических исследованиях также используется визуальная оценка (в баллах) патологических изменений в нервной ткани, хотя в современных морфологических исследованиях давно и широко используется автоматизированный анализ изображений, который позволяет дать объективную оценку количественных и качественных патологических изменений. Следует также отметить довольно низкую информативность представленных микрофотографий, а в отдельных случаях и их некорректную интерпретацию. Так, снижение внутринейронального содержания одного из ростовых факторов (BDNF), обнаруженное в иммуноцитохимическом исследовании, трактуется диссертантом как показатель усиления его выделения. Это вывод некорректен, поскольку внутринейрональное содержание BDNF-иммунореактивного материала, как и любого другого секретируемого белка, является результирующей нескольких процессов – выделения, деградации и синтеза.

4. Больных включали в широкий возрастной диапазоне - от 25 до 55 лет. Учитывая то, что рассеянный склероз, как и любое другое нейродегенеративное заболевание, является синдромом, нет ли при этом риска смешения больных с принципиально различной этиологией – например, моногенных (наиболее молодых) с полигенными (в преклонном возрасте).

IV. Комментарии к Выводам

В некоторых выводах имеются стилистические неточности, обусловленные тем, что они сформулированы как процесс изучения, а не как результат, полученный при проведении исследований. Так, в выводе 1 написано, что «...**изучен** репертуар аутореактивных иммуноглобулинов...». Лучше было бы написать, что «...**идентифицирован** репертуар аутореактивных иммуноглобулинов...». В выводе 4. Написано «**Детализирован** молекулярный механизм...». Хорошо бы вместо «детализирован» дать конкретный результат(ы). В выводе 6 написано «Разработаны подходы к индукции толерантности инкапсулированными фрагментами...». Напрашивается уточнение – толерантности чего к чему.

В заключении отзыва следует отметить, что приведенные комментарии ни в коей мере не умаляют многочисленных достоинств диссертации и ее автора. Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация полностью отражена в научных статьях, опубликованных автором в ведущих российских и зарубежных журналах, результаты работы доложены на отечественных и международных конференциях.

Таким образом, диссертация Белогурова А.А. «Биохимические основы аутоиммунной нейродегенерации» полностью отвечает требованиям "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор Белогуров Алексей Анатольевич заслуживает присуждения искомой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией нервных и
нейроэндокринных регуляций
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт биологии развития им. Н.К.
Кольцова Российской академии наук,
академик РАН, д.б.н.

Угрюмов Михаил Вениаминович

119334, Россия, г. Москва, ул.
Вавилова, д. 26.
Тел: +7 (499) 135-33-22
E-mail: michael.ugryumov@mail.ru

Подпись Угрюмова Михаила Вениаминовича заверяю
Ученый секретарь ФГБУН ИБР РАН к.б.н.

МП



Хабарова М.Ю.