

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 – биоорганическая химия

Аутоиммунные заболевания, развивающихся вследствие патологической выработки аутоиммунных антител или размножения аутоагрессивных клонов киллерных клеток против здоровых тканей организма, приводят к разрушению последних и к развитию аутоиммунного воспаления. Эти заболевания представляют большую проблему для современной медицины. Очевидно, что успехи в борьбе с ними напрямую зависят от наших фундаментальных знаний о природе иммунного ответа и метаболизма клеток и организмов в целом. Среди аутоиммунных заболеваний особое место занимает рассеянный склероз (РС). Впервые описанный еще в 1868 году Жан-Мартеном Шарко, РС и по сей день остается распространенной и грозной болезнью. В настоящее время в мире насчитывается около 2 млн больных РС, в России - более 150 тыс. Заболевание в основном возникает в молодом и среднем возрасте (15 - 40 лет), поражая наиболее работоспособных людей.

РС – хроническое аутоиммунное заболевание, при котором поражается миелиновая оболочка нервных волокон головного и спинного мозга (аутоиммунная нейродегенерация), причем очаги склероза рассеяны по всей центральной нервной системе без определённой локализации. По-настоящему эффективных методов лечения пока не создано, терапия сводится в основном к лечению обострений. Естественно, что новые фундаментальные исследования в этой области, часто имеющие непосредственный выход в практику, являются весьма актуальными и востребованными широким кругом специалистов. Именно к таким исследованиям относится работа А.А. Белогурова, ставящая задачей изучение молекулярных основ протекания аутоиммунной нейродегенерации на примере РС, а также создания на основе этого знания препаратов нового поколения для лечения данной патологии. В процессе выполнения диссертационной работы автором открыт и исследован ряд важных аспектов этиологии и патогенеза аутоиммунной нейродегенерации и РС в частности.

Диссертационная работа Белогурова А.А. охватывает целый ряд фундаментальных и прикладных задач, решению которых посвящены соответствующие разделы диссертации. Среди этих задач: (1) изучение репертуара аутореактивных природных поли-

и моноклональных антител к миелиновым антигенам; (2) экспериментальное исследование гипотезы молекулярной мимикрии как одного из вариантов развития РС; (3) Открытие феномена убиквитин-независимой внутриклеточной деградации физиологически значимого аутоантигена – основного белка миелина – протеасомой, а также связь механизма данного процесса с патогенезом аутоиммунной нейродегенерации; (4) дизайн, структурно-функциональный анализ модульных бифункциональных иммунотоксинов, позволяющих проводить узконаправленную элиминацию заранее предопределенных популяций патологических лимфоцитов и тестирование их *in vivo*; (5) индукция толерантности иммунной системы к миелину путем введения инкапсулированных иммунодоминантных фрагментов основного белка миелина; (6) терапия аутоиммунной нейродегенерации путем введения ингибиторов каталитических субъединиц иммунопротеасомы.

Работа содержит 230 страниц, 87 рисунков и 13 таблиц. Диссертация выполнена по традиционной схеме и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Литературный обзор имеет объем чуть больше сорока страниц и содержит пять основных разделов. В первом автор дает исчерпывающую характеристику патогенезу аутоиммунной нейродегенерации, уделяя наибольшее внимание форме заболевания у человека – рассеянному склерозу. Далее следует описание основных компонентов иммунной системы, которые играют основную роль в этиологии и патогенезе заболевания. Автор подробно рассматривает участие гуморальной ветви адаптивного иммунного ответа, что в дальнейшем позволяет более полно оценивать результаты, полученные в работе. Третья часть литературного обзора посвящена механизмам деградации экзогенных и эндогенных антигенов, а также их дальнейшей презентации на комплексах гистосовместимости первого и второго классов. Четвертая часть описывает существующие животные модели рассеянного склероза, называемые экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом. Наконец, заключительная пятая часть суммирует существующее знание о подходах к терапии аутоиммунной нейродегенерации, логичным образом подытоживая литературный обзор. Обзор прекрасно иллюстрирован рисунками высокого качества. Общее количество ссылок составляет 428 источников, большое количество из которых представляет собой работы последних лет, что наглядно свидетельствует об актуальности предмета исследования. Мне хотелось бы особо приветствовать такое построение литературного обзора – автор в сжатой, но чрезвычайно убедительной форме описал основной круг тех проблем современной иммунологии, в которые вносит вклад его работа. Автор не стал чрезмерно детализировать литературные данные (как это часто

бывает), а предпочел изложить читателю свое видение проблем широкими мазками. Для читателя, не являющегося узким специалистом в данной области (к каковым принадлежу и я) полностью раскрыта базовая информация, на которой основана диссертационная работа.

Раздел «Материалы и Методы» подробно и обстоятельно описывает все экспериментальные процедуры, задействованные в процессе выполнения диссертационной работы. При чтении раздела поражаешься тому, каким широким кругом самых разнообразных методов владеет автор. Это и работа с бактериальными и эукариотическими культурами клеток, а также лабораторными животными, основные иммунологические и иммунохимические методы, основные приемы генетической и белковой инженерии, биохимические методы и многое-многое другое. Уровень детализации методик не оставляет сомнений в возможности их воспроизведения. Наряду с стандартными методами «Материалы и Методы» содержат ряд уникальных методик, к примеру, конверсию иррелевантного белка в убиквитин-независимый протеасомный субстрат путем многостадийной конъюгации с линейными полиаминами.

Около половины объема диссертации занимает раздел «Результаты и обсуждение». Эта часть работы наиболее богата иллюстрациями, общее количество которых достигает 61. Автор постарался ввести в иллюстративный материал практически все экспериментальные данные. По моему мнению, это не всегда оправдано – часть рисунков (состоящих из 3-5 составных частей) выглядят перегруженными и иногда достаточно трудны для восприятия. Это замечание, впрочем, нисколько не умаляет по-настоящему выдающихся экспериментальных данных, полученных А.А. Белогуровым.

«Результаты и обсуждение» состоят из тесно взаимосвязанных разделов «Изучение биохимических аспектов аутоиммунной нейродегенерации» и «Новые подходы к терапии рассеянного склероза».

В первой части Белогуров А.А. докладывает результаты структурно-функционального анализа репертуара иммуноглобулинов при аутоиммунной нейродегенерации. Изначальные данные были получены на поликлональных сыворотках от пациентов с рассеянным склерозом и модельных животных с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (основная животная модель РС). В результате удалось картировать наиболее иммунодоминантные области основного белка миелина, являющегося одним из главных аутоантигенов при рассеянном склерозе. Во второй части диссертации эта информация позволило создать бифункциональные иммунотоксины на основе константного фрагмента иммуноглобулина и ряда бактериальных токсинов, способных к направленной элиминации аутореактивных лимфоцитов за счет

«направляющей» пептидной последовательности. Последующая инкапсуляция данных пептидов в маннозилированные липосомы позволило эффективно ингибировать не только развитие модельного заболевания, развиваемого в экспериментальных животных, но и успешно провести начальные фазы клинических испытаний на пациентах с рассеянным склерозом.

Еще один важный раздел, присутствующий в первой части диссертационной работы Белогурова А.А., описывает создание и дальнейший анализ фаг-дисплейной библиотеки переменных фрагментов антител, присутствующих в репертуаре иммуноглобулинов пациентов с рассеянным склерозом. Автору удалось получить взаимно-однозначное соответствие «структура»-«функция» для миелин-реактивных антител. В процессе исследования удалось физически подтвердить гипотезу вирусной этиологии рассеянного склероза, а также оценить вклад тяжелой и легкой цепей антитела в результирующую стабильность аффинитета антител. Проведенное широкомасштабное секвенирование репертуаров антител, обогащенные на собственные и вирусные антигены, позволило выявить зародышевые линии, характерные для миелин-, вирус- и кросс-реактивных антител.

Отдельного упоминания заслуживает раздел в первой части раздела «Результаты и обсуждение», который посвящен открытию нового класса убиквитин-независимых дегенонов. Автором было показано, что положительный заряд может служить в качестве сигнала убиквитин-независимой протеасомной деградации, на примере основного белка миелина детально разрешен механизм данного процесса. В своей работе Белогуров А.А. продемонстрировал, что химическая конъюгация белков с основными низкомолекулярными веществами, например со 1,3-спермином, придает им свойства убиквитин-независимых протеасомных субстратов.

Резюмируя, можно утверждать, что работа Белогурова А.А. выполнена на самом высоком теоретическом и экспериментальном уровнях. В результате выполнения работы создано новое оригинальное научное направление, а наши знания как о молекулярных механизмах развития РС, так и о новых подходах к его терапии существенно возросли. Недостатки работы совершенно теряются среди ее достоинств и носят главным образом редакционный характер. Так, обозначение аденозинтрифосфата как «АТФ» не соответствует принятым в настоящее время нормам. Рисунки в главе «Заключение», в которой прекрасно суммируется проделанная работа, тем не менее требуют более обширного комментария (в первую очередь рис. 5-4). Вывод 2 было бы лучше конкретизировать, указав на результаты работы. Однако эти замечания никак не могут ослабить общее впечатление от прекрасной работы А.А. Белогурова.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация полностью отражена в научных статьях, опубликованных автором в ведущих российских и зарубежных журналах, результаты работы доложены на самых престижных отечественных и международных конференциях.

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 ему искомой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией
молекулярных основ действия
физиологически активных соединений
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт молекулярной биологии им.
В.А. Энгельгардта Российской
академии наук, чл.-корр. РАН, д.х.н.

Кочетков Сергей Николаевич

ГСП-1, 119991, г. Москва, ул.
Вавилова, д. 32.
Тел: +7 (499) 135-23-11
E-mail: kochet@eimb.ru

Подпись Кочеткова Сергея Николаевича заверяю

Ученый секретарь ФГБУН ИМБ РАН
к.в.н. Бочаров А.А.

