

## Отзыв

**официального оппонента на диссертационную работу Ломакина Я.А. «Структурно-функциональный анализ моноклональных антител, кроссреактивных к вирусным антигенам, при рассеянном склерозе», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.**

Рассеянный склероз - хроническое заболевание центральной нервной системы, для которого характерно образование множественных очагов демиелинизации в головном и спинном мозге, а также зрительном нерве. Поражает рассеянный склероз в основном лиц молодого и среднего возраста.

Этиология и патогенез остаются во многом неизвестными, несмотря на обилие молекулярно-биологических данных и клинических наблюдений, до сих пор не удалось понять механизмы индукции рассеянного склероза. В качестве факторов, влияющих на его возникновение, называются наследственная предрасположенность, гормональный статус организма, вредные привычки, а также бактериальные или вирусные инфекции.

К настоящему времени широко обсуждается гипотеза, что аутоантитела против основного белка миелина (ОБМ) являются одной из возможных причин дегенерации миелиновых оболочек при рассеянном склерозе.

Согласно современным представлениям, для развития рассеянного склероза необходима активация не только Т-клеток, но и В-клеточного звена иммунитета. Выявление антигенов, которые индуцируют образование аутоантител при РС важно для понимания механизмов развития заболевания, а также для разработки новых подходов к диагностике и терапии РС.

Таким образом, актуальность темы представленной диссертационной работы не вызывает сомнения.

Диссертационная работа Ломакина Я.А. посвящена выявлению вирусных антигенов, способных индуцировать выработку аутоантител к компонентам миелиновой оболочки, возможно, играющих роль в патогенезе РС, а так же структурно-функциональному анализу этих аутоантител.

Для решения этой проблемы были поставлены следующие задачи:

1. Получение моноклональных одноцепочечных антител из фаг-дисплейной библиотеки РС, специфичных к основному белку миелина, и определение их структур.
2. Создание полноразмерных моноклональных иммуноглобулинов человека на основании одноцепочечных антител, связывающих основной белок миелина, и доказательство их функциональности.
3. Характеризация миелин-реактивных аутоантител больных РС.
4. Определение поли- и кроссреактивности моноклональных миелин-реактивных аутоантител больных РС.

Диссертация изложена на 119 страницах и содержит 33 рисунка и 8 таблиц.

В разделе «Обзор литературы» диссертант рассматривает несколько крупных тем, существенных для понимания экспериментальной части диссертации. Несколько глав обзора литературы посвящены роли Т и В клеточного компонентов иммунной системы и их взаимодействия в патогенезе РС, этиологии РС и роли вирусных инфекций в развитии этого заболевания. Затем автор переходит к описанию метода комбинаторных библиотек, как наиболее адекватного подхода для установления связи между структурой и функцией «патогенных» антител. Обзор литературы ясно показывает, что его автор прекрасно знаком с современной литературой по теме диссертации и дает основу для понимания последующих разделов работы. Обзор после редактирования может быть опубликован как отдельная монография.

В разделе «Экспериментальная часть» изложены полученные автором результаты и проведено их подробное обсуждение. Спектр примененных в диссертации методов очень широк, описание методов составило 20 страниц. Я.А. Ломакиным использованы самые современные протоколы молекулярной биологии и биохимии, причем некоторые методы подверглись существенной доработке и модификации (например, был использован целый ряд экспериментальных подходов для уменьшения неспецифического

связывания высоко заряженного белка ОБМ при скрининге фаг-дисплейной библиотеки).

В результате скрининга автором охарактеризовано 13 моноклональных антител, специфичных к этому белку. Показана высокая гомология с рядом антител из cerebro-спинальной жидкости больных РС. Была выявлена гомология с антителами к белку Imp1 вируса Эпштейна-Барр, для которого ранее была предположена роль в индукции РС

В следующей части работы автор проверил функциональность ранее отобранных антител в виде IgG человека. Я. А. Ломакину впервые удалось показать кроссреактивность моноклонального антитела больного РС с белком ОБМ и вирусным белком Imp1.

Далее автором было проведено изучение влияния тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов на узнавание антигена и изменение аффинности антитела. В результате этой части работы показано, что полиреактивность аутоантител при РС может реализовываться за счет сочетания двух цепей – тяжелой и легкой, каждая из которых в большей степени отвечает за связывание своего антигена.

В последней части экспериментального раздела, после дополнительного обогащения фаг-дисплейной библиотеки на белки MOG и Imp1, с помощью широкомасштабного секвенирования библиотек диссертантом были определены гены зародышевой линии, характерные для аутореактивных антител, специфичных к ОБМ.

Очень интересной представляется концепция развития РС, представленная Я.А. Ломакиным в заключительной части работы. Автор предполагает, что в результате иммунного ответа на определенные вирусные белки образуется некое число кроссреактивных с ОБМ антител, которые, при попадании в ЦНС, могут инициировать разрушение миелиновой оболочки. Поскольку автором в процессе работы показана высокая гомология

аутоантител с противовирусными антителами, теория представляется вполне обоснованной.

По работе есть несколько замечаний.

1. Диссертация содержит традиционные разделы – введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение, материалы и методы, выводы, список литературы. Почему-то расположение этих разделов не совсем традиционное – так, материалы и методы следуют за разделом «результаты», разделяя собой заключение и выводы, что не очень удобно для прочтения.
2. В разделе «обзор литературы» главы «рассеянный склероз» и «этиология рассеянного склероза» разнесены друг от друга на три главы, что представляется не очень логичным. Наверное, эти главы логичнее было расположить друг за другом, а уже потом писать о роли Т и В клеток в РС и о вирусах.
3. Текст обзора литературы и результатов изобилует аббревиатурами, часть из них –русские, часть –английские, причем русские аббревиатуры не очень привычны-например, аббревиатура «ФСБ» вряд ли даже в сознании ученого напрямую ассоциируется с фосфатно-солевым буфером, тем более, что в большинстве случаев он в тексте диссертации называется PBS. Диссертация, несмотря на то, что изложена логично, очень трудно читается именно из-за смеси русских и английских терминов. В качестве примера можно привести фразу «Выделение и очистка рекомбинантных фьюжн-белков txh-обм пептидов».
4. На рис. 19 показано определение аутореактивности антител к ОБМ с помощью Вестерн-блот анализа лизата Нер-2. Возможно, следовало бы не просто давать ссылку на статью, где был использован НЕР-2 тест, но и кратко объяснить, в чем он заключается. Сам рисунок, из-

за недостаточного размера и разрешения, трудно понять, и объяснений в тексте нет, кроме перечисления белков, которые связываются комбинационными антителами.

Рисунки 20 и 21 (иммуноферментный анализ связывания антител с ОБМ и изменение аффинности при варьировании цепей) тоже «слепые», и подписаны более чем лаконично. Если с ИФА как-то можно разобраться, что человек, никогда не проводивший анализ на приборе VIACORE, в рисунке просто не разберется, потому что объяснения в тексте почти отсутствуют.

Сделанные замечания не принципиальны и не снижают общей высокой оценки работы. Автором получены новые экспериментальные данные, которые имеют важное научное значение и могут быть использованы целым рядом научных организаций, например, ИБХ РАН, ИМБ РАН, НИИ ФХМ ФМБА России, ИХБФМ СО РАН. Полученные результаты вносят существенный вклад в прояснение этиологии и патогенеза рассеянного склероза.

Результаты работы опубликованы в рецензируемых международных журналах, неоднократно доложены на международных и российских конференциях по теме диссертации. Экспериментальные статьи и тезисы говорят об авторском вкладе в проведенные исследования, полностью отражают содержание диссертации, а выводы соответствуют полученным данным. Автореферат отражает содержание диссертации и соответствует материалам, изложенным в диссертационной работе.

Все вышеизложенное позволяет констатировать, что диссертация Якова Анатольевича Ломакина, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, является законченным самостоятельным научным исследованием и представляет собой научно-квалификационную работу, которая соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении

ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

М. А. Лагарькова, д.б.н.  
Зав. лабораторией генетики развития  
ИОГен РАН  
(Москва, 119991, ГСП-1, ул. Губкина, д.3)

Подпись  
удостоверяю

Ученый секретарь ИОГен РАН  
доктор биологических наук



Огаркова О.А.