ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Меламуда Марка Марковича «Аларминины и антитела к ним в патогенезе системной красной волчанки», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия

Актуальность исследования

Диссертационная работа Меламуда Марка Марковича посвящена изучению роли аларминов и аутоантител к ним в патогенезе системной красной волчанки (СКВ). СКВ представляет собой тяжелую мультисистемную аутоиммунную патологию, характеризующуюся генерализованным нарушением иммунной толерантности. Несмотря на успехи современной терапии, заболевание остается неизлечимым, а рост заболеваемости среди женщин репродуктивного возраста обусловливает высокую социально-экономическую значимость проблемы. Согласно современным представлениям, одну из главных ролей в инициации воспаления при СКВ играют аларминины (внеклеточная ДНК, гистоны, белок группы высокой подвижности 1 (HMGB1)), высвобождающиеся при клеточной гибели и нетозе. Однако вклад этих молекул в активацию провоспалительных процессов, а также данные об их концентрации при СКВ до сих пор остаются фрагментарными, а механизмы образования аутоантител к ним недостаточно изучены.

Особую актуальность работе придаёт комплексный подход к изучению не только классических высокоаффинных, но и каталитических антител (абзимов) . Известно, что патогенез СКВ неразрывно связан с образованием анти-ДНК антител, образующих патологические иммунные комплексы. В то же время феномен антител, способных гидролизовать свои антигены (ДНК, гистоны, HMGB1), известен давно, однако, как справедливо отмечает диссертант, их биологическая роль – патогенетическая или, напротив, защитная и компенсаторная – до сих пор остается предметом дискуссий. Изучение сопряженности каталитической активности IgG с клиническими проявлениями болезни и цитокиновым профилем организма , а также анализ динамики концентрации внеклеточной ДНК и антител к ней на экспериментальной

модели, имеет как фундаментальное значение для понимания эволюции аутоиммунного ответа, так и практическое – для разработки новых подходов к диагностике и терапии СКВ.

Научная новизна и значимость работы

В работе впервые проведён обширный анализ аларминов и аутоантител к ним у пациентов с СКВ и на пристан-индуцированной мышиной модели СКВ. Одновременно исследованы алармины, маркёры нетоза, цитокины, аутоантитела к аларминам, в том числе антитела с каталитическими активностями. Использование пристан-индуцированной модели СКВ позволило впервые обнаружить динамическую связь между концентрацией внеклеточной ДНК и антителами к двуцепочечной ДНК. Впервые показано, что у пациентов с СКВ повышение концентрации аларминов намного сильнее ассоциировано с процессом нетоза по сравнению с другими ревматическими заболеваниями. Впервые продемонстрировано, что пациенты с СКВ разделяются на две группы с низким и высоким уровнем ДНК-гидролизующей активности IgG, причём эти группы достоверно отличаются по ряду клинических параметров. Показано, что ДНК-гидролизующая активность IgG может играть положительную роль, так как обнаружена обратная зависимость между уровнем этой активности и активностью заболевания (индекс SELENA-SLEDAI). Также показано, что IgG пациентов с СКВ обладают протеолитической активностью в отношении гистонов (H1, H2A, H2B и H4), а также впервые — в отношении HMGB1, причём гидролиз происходит в сайте, расположенном в B-бокс-домене белка, что, возможно, снижает его провоспалительные свойства.

Полученные данные расширяют представления о молекулярных механизмах патогенеза СКВ. Обнаружение обратной динамики между концентрацией антител к двуцепочечной ДНК и внеклеточной ДНК на мышиной модели указывает на важность учёта временного фактора при анализе этих показателей, что может объяснять неоднородность результатов поперечных исследований. Установлено, что IgG гидролизуют HMGB1 в его специфической области, ответственной за провоспалительные свойства, что

потенциально снижает аларминную активность белка. На базе этих данных могут быть созданы терапевтические моноклональные антитела со схожей активностью. Таким образом, ДНК-гидролизующая активность антител является потенциально эффективным диагностическим маркёром при СКВ, а выявленные закономерности имеют важное значение для разработки новых подходов к оценке активности заболевания и таргетной терапии.

Содержание и оформление диссертации

Диссертационная работа включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Общий объем рукописи составляет 141 страницу; текст проиллюстрирован 32 рисунками, дополнен 15 таблицами и 1 приложением. Библиографический список насчитывает 333 источника. Структура и оформление работы полностью отвечают требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Во введении обоснована актуальность темы, связанная с необходимостью понимания роли аларминов и аутоантител в патогенезе СКВ. Сформулированы цель и пять задач исследования, направленных на оценку концентрации аларминов и маркёров нетоза, анализ аутоантител к ним, изучение каталитических активностей IgG и их связи с клиническими и цитокиновыми параметрами, а также исследование динамики внеклеточной ДНК и антител к ней на мышиной модели. Отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, а также положения, выносимые на защиту. Первая глава (обзор литературы) содержит анализ современных представлений об этиологии и патогенезе СКВ, роли аларминов, аутоантител, включая каталитические, а также мышиных моделях заболевания. Отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, а также положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы посвящен современным представлениям об этиологии и патогенезе системной красной волчанки, роли аларминов (внеклеточной ДНК, гистонов, HMGB1) и маркёров нетоза в развитии заболевания. Детально

разобраны механизмы образования аутоантител к аларминам, их канонические и неканонические функции, а также существующие мышиные модели СКВ. Значительная часть обзора посвящена анализу литературных данных о каталитических антителах при различных патологиях, что обосновывает выбор направления исследования. Особо хочу отметить глубину проработки результатов современных исследований практически по всем аспектам аутоиммунного заболевания, каким является СКВ. В дальнейшем на основе этого литературного обзора может быть написана монография.

В методической части описаны используемые реактивы, оборудование, клинические выборки пациентов с ревматическими заболеваниями и здоровых доноров, а также дизайн экспериментов на пристан-индуцированной модели СКВ у мышей. Подробно изложены методы выделения и определения концентрации внеклеточной ДНК (флуориметрия, цифровая ПЦР), иммуноферментного анализа для оценки аларминов, цитокинов и аутоантител, аффинной хроматографии для выделения IgG и методы оценки их каталитической активности (ДНК-, гистон- и HMGB1-гидролизующей). Отдельно представлены подходы к статистической обработке данных, включая кластеризацию (DBSCAN) и анализ ковариации.

Глава «Результаты и обсуждения» – основная часть работы, состоящая из пяти разделов. В разделе 3.1 приведена клинико-анамнестическая характеристика двух независимых выборок пациентов с СКВ и здоровых доноров, а также групп сравнения с другими ревматическими заболеваниями (РА, АС, ПсА). Представлены данные о поле, возрасте, длительности заболевания, клинических индексах активности (SELENA-SLEDAI, DAS28, ASDAS, BASDAI, DAPSA), серологических маркёрах (анти-дцДНК, анти-оцДНК) и проводимой терапии, что подтверждает сопоставимость групп и корректность дальнейшего анализа.

В разделе 3.2 представлены результаты анализа концентрации аларминов и маркёров нетоза в плазме крови. Показано достоверное повышение уровней общей, ядерной и митохондриальной внеклеточной ДНК, HMGB1,

цитруллинированного гистона H3 и миелопероксидазы у пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми донорами и пациентами с другими ревматическими заболеваниями. С использованием метода PLS-DA продемонстрировано, что комбинированный профиль этих маркёров при СКВ значимо отличается от такового у здоровых доноров. Выявлены корреляции маркёров нетоза с клиническими проявлениями заболевания, в том числе с поражением почек и сердечно-сосудистыми осложнениями.

В разделе 3.3 охарактеризованы уровни аутоантител к аларминам. Показано повышение концентрации антител к одно- и двуцепочечной ДНК, гистонам и HMGB1 у пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми донорами. Установлено, что связь с тяжестью заболевания, оцениваемой по индексу SELENA-SLEDAI, обнаруживается только для антител к ДНК, что подтверждает их высокую специфичность. Выявлены корреляции анти-ДНК антител с провоспалительными цитокинами (TNFα, IFNα2), указывающие на их участие в воспалительных процессах.

В разделе 3.4 приведены результаты изучения каталитической активности IgG. Показано, что IgG пациентов с СКВ гидролизуют ДНК, гистоны (H1, H2A, H2B, H4) и HMGB1, причём уровень этой активности достоверно выше, чем у здоровых доноров. Установлено, что пациенты с СКВ разделяются на подгруппы с высокой и низкой ДНК-гидролизующей активностью, различающиеся по клиническим характеристикам. Обнаружена обратная связь ДНК-гидролизующей активности с тяжестью заболевания по индексу SELENA-SLEDAI, что указывает на возможную положительную роль каталитических антител в патогенезе СКВ.

В разделе 3.5 представлены результаты экспериментов на пристан-индуцированной модели СКВ у мышей. Описано развитие СКВ-подобного состояния, включая алопецию, потерю шерсти и увеличение массы тела. Показана динамика концентрации внеклеточной ДНК и антител к двуцепочечной ДНК в течение 36 недель после иммунизации. Впервые обнаружена обратная ассоциация между изменениями концентраций

внеклеточной ДНК и анти-дцДНК антител в период с 14 по 28 неделю, что указывает на динамический характер взаимосвязи этих показателей и важность учёта временного фактора.

Следовательно, представленная диссертация выполнена и оформлена в полном соответствии с требованиями, предъявляемыми к работам такого уровня. Содержание автореферата согласуется с текстом диссертации, а опубликованные автором работы в полной мере отражают её основное содержание. Ключевые научные положения и выводы диссертационного исследования подкреплены экспериментальными данными.

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современных методов (иммуноферментный анализ, цифровая ПЦР, мультиплексный анализ цитокинов, аффинная хроматография, электрофорез в ПААГ и агарозном геле, вестерн-блоттинг); применением стандартных иммунологических и биохимических подходов; корректным использованием методов статистического анализа (критерии Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса, Уилкоксона, Спирмена и Кендалла, ANCOVA, множественная линейная регрессия, алгоритм DBSCAN) с учётом поправок на множественные сравнения. Достоверность также подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных на двух независимых клинических выборках и валидностью использованных коммерческих тест-систем.

Основные результаты диссертационного исследования в достаточном объёме отражены в публикациях. Материалы работы опубликованы в 5 статьях в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Помимо этого, результаты исследования были доложены автором на 6 российских и международных конференциях, среди которых OPENBIO, BGRS, «Актуальные проблемы медико-биологических дисциплин» и «Молекулярные основы заболеваний: что молекулярная биология может сделать для современной медицины».

Общие вопросы и замечания

1.Определяли ли Вы антитела , в том числе абзимы раздельно к нативной и денатурированной ДНК .?

2.Поскольку у Вас такой обширный и глубокий анализ современной научной литературы не попадались ли Вам сведения о гидролизующих антителах при инфекционно-воспалительных заболеваниях, особенно при деструктивных процессах?

3.Были ли сопутствующие заболевания, сопряженные с СКВ?

Представленные мной вопросы не затрагивают качество диссертационной работы, а могут указывать на направления дальнейших исследований, в том числе и при злокачественных новообразованиях. Замечаний по диссертационной работе М.М. Меламуда у меня нет.

Заключение

Представленная к защите работа М. М. Меламуда «Аларминны и антитела к ним в патогенезе системной красной волчанки» является законченным научным трудом, выполненным на высоком методическом и теоретическом уровне. Автором получены новые данные о повышении концентрации широкого спектра аларминов (внеклеточной ДНК, гистонов, HMGB1) и маркёров нетоза при СКВ. Впервые показано наличие у IgG пациентов HMGB1c гидролизующей активностью, причём гидролиз происходит в участке белка, ответственном за его провоспалительные функции. Важным фактом , обнаруженным в этом исследовании является то, что повышение ДНК-гидролизующей активности антител ассоциировано со снижением активности заболевания (по индексу SELENA-SLEDAI), а также выявлена динамическая обратная связь между уровнями внеклеточной ДНК и анти-дцДНК антител в эксперименте на мышах. Положительные аспекты диссертации не вызывают сомнений: работа отличается научной новизной, практической значимостью, комплексным подходом, качественным биоинформационным и статистическим анализами, большим объёмом экспериментального материала. Диссертация содержит решение задачи, имеющей значение для развития молекулярной биологии и биохимии – расширение представлений о роли аларминов,

аутоантител и каталитических IgG в патогенезе СКВ. Полученные данные соответствуют пунктам 4, 6, 11 и 12 паспорта специальности 1.5.4 – Биохимия.

Диссертационная работа Меламуда Марка Марковича по актуальности темы, объёму, научной новизне, теоретической и практической значимости отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН для диссертаций, представленных на соискание учёной степени кандидата наук. Диссертационная работа Меламуда Марка Марковича полностью соответствует требования пп. 2.1 – 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации, Меламуд Марк Маркович, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ), доктор биологических наук, профессор

Аутеншлюс Александр Исаевич

тел. рабочий +7(383)2749550, 89059527502, e-mail: lpciip@211.ru

Адрес: 630060, Новосибирск, улица Тимакова, 2

Подпись: _____

Дата: 11.11.2026

Подпись д.б.н. профессора Аутеншлюса Александра Исаевича

Заверяю : Ученый секретарь ФИЦ ФТМ, д. б. н., профессор

Молодых Ольга Павловна _____ 11.11.2026 г.