

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора, и. о. заведующего кафедрой фармакологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» Ленской Карины Владимировны на диссертацию Некрасовой Ксении Александровны «Экспериментальное исследование рекомбинантного антитела, блокирующего активацию комплемента, при травматическом повреждении головного мозга», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Актуальность темы диссертационного исследования

Диссертационная работа Некрасовой Ксении Александровны посвящена актуальной проблеме - цереброваскулярным заболеваниям (ЦВЗ), в том числе инсульту, черепно-мозговым травмам (ЧМТ), осложнениям, вызванных данными патологиями и приводящими к инвалидизации пострадавших из-за частой потери памяти, нарушений функций опорно-двигательного аппарата. В структуре смертности населения России ЦВЗ занимают второе место после ишемической болезни сердца. В свете этого данная тематика является важной социально-экономической проблемой здравоохранения.

В настоящее время достигнут ряд значительных успехов в профилактике и лечении инсульта, а также в догоспитальной и интенсивной терапии ЧМТ. Однако, несмотря на это, 30-50% пациентов, своевременно получивших терапию, остаются инвалидами.

Вх. № 47
«06» 12 2022г.
ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России
Диссертационный совет

Поскольку общей чертой основных заболеваний, поражающих центральную нервную систему, является воспаление, а известно, что наибольший вклад в этиологию воспаления вносят продукты активации системы комплемента, подход к лечению острых ишемических и травматических повреждений головного мозга, основанный на блокировании системы комплемента, представляется убедительным. Кроме того, есть данные достаточно многочисленных исследований различных ингибиторов комплемента на моделях ишемического инсульта и ЧМТ у животных, подтверждающие возможность коррекции ЦВЗ с помощью подобных препаратов.

Детальное изучение и научное обоснование подхода к лечению травматического повреждения головного мозга, основанного на блокировании активации комплемента с помощью рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 к неопредетерминанте C3 компонента комплемента человека, является актуальной научной задачей.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Обоснованность и достоверность результатов исследований определяется большим объёмом проведенного исследования, осуществленного с использованием информационно-аналитического, статистического и других видов анализа.

Адекватный дизайн проведённого исследования, корректная статистическая обработка полученных результатов, их чёткое представление в виде обстоятельных описаний, рисунков и таблиц, а также достаточный анализ позволяют классифицировать результаты настоящей работы как достоверные, а положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации как обоснованные.

Диссертационную работу отличают высокое методологическое качество и строгий научный подход к изучению проблемы.

Положения, выносимые на защиту, обоснованы и характеризуются достоверностью и новизной. Автором проведен подробный анализ зарубежной и отечественной литературы по теме диссертационного исследования, подтверждающий актуальность выбранной научной проблемы.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на научных и научно-практических конференциях международного уровня (Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», IV научно-практическая школа-конференция «Аллергология и клиническая иммунология» (иммунодиагностика, иммунопрофилактика и иммунотерапия иммунозависимых и инфекционных болезней), Международный объединенный иммунологический форум - 2019). По теме диссертационного исследования опубликовано 4 научные работы, из них 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Научная новизна работы не вызывает сомнения.

Автором впервые изучен механизм действия инновационного рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 к неопредетерминанте C3 компонента комплемента человека. Показано, что антитело не блокирует классический путь активации комплемента, но блокирует альтернативный путь (АП) активации. При этом установлено, что участок связывания с антителом hC34 расположен на формах C3i, C3b и C3c, возникающих в результате гидролиза тиоэфирной связи. Это также согласуется с выводом о том, что изученное антитело эффективно блокирует именно альтернативный путь активации комплемента, поскольку в отличие от других путей активация АП осуществляется за счет постоянно существующего медленного гидролиза тиоэфирной связи C3 компонента.

Установлено, что аналог рекомбинантного антитела hC34 – моноклональное антитело 3A8, специфичное С3 компоненту комплемента крысы – обладает фармакологической активностью в модели закрытой черепно-мозговой травмы, выражающейся в четкой тенденции к сохранению памятного следа у животных, перенесших ЗЧМТ, в тесте оценки сохранности УРПИ, в снижении выраженности гистологической картины ЗЧМТ и достоверном и дозозависимом снижении процента погибших нейронов в гипоталамусе (с 50 % погибших нейронов в области СА3 гиппокампа в контрольной группе до 28 % - в группе животных, получавших препарат в дозе 125 мг/кг, и 20 % - в группе животных, получавших препарат в дозе 250 мг/кг).

Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации

Научная и практическая значимость настоящей работы определяется полученными в ходе проведённых исследований результатами, имеющими, как научную ценность, заключающуюся в экспериментальном обосновании нового подхода к лечению травматического повреждения головного мозга с помощью рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека: диссертантом получены экспериментальные данные *in vitro* и *in vivo*, убедительно демонстрирующие, что блокирование активации системы комплемента разработанным антителом, обеспечивает проявление его церебропротекторной активности - так и практическую ценность.

Практическая значимость диссертационной работы определяется тем, что в результате проведенных исследований показано, что лекарственная форма рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 безопасна и может быть рекомендована для проведения дальнейших доклинических и последующих клинических испытаний. Это в конечном итоге открывает перспективу разработки нового средства лечения травмы головного мозга и

профилактики осложнений, связанных с избыточной активацией системы комплемента, а также перспективу дальнейшей разработки темы в направлении исследования специфической фармакологической активности антитела hC34 на модели ишемического инсульта.

Кроме того, использованный в ходе исследования механизма действия *in vitro* метод оценки ингибирования антителом hC34 продукции анафилатоксинов C3a и C5a был положен в основу метода определения специфической активности антитела hC34 – одного из принципиальных показателей, определяющих качество препаратов антител. Разработанный метод включен в проект нормативной документации на препарат.

Оценка содержания диссертации

Структура, содержание и оформление диссертации. Результаты исследования представлены на 168 страницах печатного текста. Диссертация состоит из введения, аналитического обзора научной литературы, описания материалов и методов исследования, изложения собственных результатов, заключения, выводов, списка сокращений с условными обозначениями и списка литературы. Текст иллюстрирован 27 таблицами, 18 рисунками. Список литературы включает 217 отечественных и зарубежных источников.

Во введении раскрыта актуальность рассматриваемой проблемы, четко сформулированы цель и соответствующие задачи исследования, определены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, ясно описаны методология работы, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробации результатов, личный вклад автора в проведенное исследование, структура и объем работы.

В первой главе (обзор научной литературы) автором изложена проблема ингибирования функции анафилатоксинов комплемента при патологиях центральной нервной системы, где подробно рассматриваются механизмы активации комплемента и опосредованной комплементом патологии центральной нервной системы и подтверждается роль системы

комплемента в патогенезе инсульта и вторичных повреждений после черепно-мозговой травмы с помощью литературных клинических данных. Обосновывая задачи собственных исследований, диссертант представляет результаты исследований специфической активности ингибиторов функции анафилатоксинов комплемента на моделях инсульта и черепно-мозговой травмы *in vivo* и кратко описывает состояние исследований в области клинической разработки лекарственных препаратов, ингибирующих эффекторную функцию системы комплемента.

Обзор научной литературы носит аналитический характер, подчёркивая глубокое понимание и знание автором проблемы в целом и указывая на существование недостаточно известных аспектов проблемы.

В главе «Материалы и методы исследования» автором представлена информация о методологических подходах и использованных методах исследования. В частности, описаны объекты исследования и используемые экспериментальные животные, методики изучения действия антитела hC34 на активацию классического и альтернативного пути комплемента в гемолитическом тесте, изучения ингибирования продукции C3a и C5a методом иммуноферментного анализа, идентификации участка связывания с антителом hC34 на молекуле C3 методом поверхностного плазмонного резонанса, моделирования ЗЧМТ у крыс с использованием свободно падающего груза и оценки специфической фармакологической активности препарата на модели в тесте оценки сохранности условного рефлекса пассивного избегания и гистологическом исследовании. Кроме того, в главе описаны общепринятые методики изучения фармакокинетики и безопасности рекомбинантного гуманизированного антитела hC34. Необходимо отметить, что набор использованных методов исследования достаточно широк и соответствует современному уровню экспериментальных исследований.

В главе, посвященной описанию результатов исследования, представлены собственные авторские данные и содержатся результаты экспериментального обоснования подхода к лечению травматического

повреждения головного мозга, основанного на блокировании активации комплемента с помощью рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 к неопределяемому C3 компоненту комплемента человека. Изучен механизм действия антитела hC34 *in vitro*. В гемолитическом тесте и по ингибированию продукции C3a и C5a показано, что антитело не блокирует классический путь активации комплемента, но блокирует альтернативный путь активации в молярном недостатке по отношению к общему количеству C3 в дозе проб проб плазмы крови. Методом поверхностного плазмонного резонанса произведена оценка специфичности антитела hC34 по отношению к различным молекулярным формам C3 компонента, которые образуются в результате процессинга этой молекулы, обусловленного активацией комплемента. В экспериментах *in vivo* автором показано, что моноклональное антитело 3A8, специфичное C3 компоненту комплемента крысы – аналог разрабатываемого антитела hC34 - обладает фармакологической активностью в модели ЗЧМТ, по данным функционального и гистологического исследований. Кроме того, экспериментальное обоснование включает в себя результаты изучения фармакокинетики и безопасности лекарственной формы антитела.

В заключении автором проанализированы в сравнительном аспекте и интерпретированы полученные в процессе исследования результаты. Содержательные и обоснованные выводы, соответствующие поставленной цели и задачам, логически завершают диссертационную работу.

Основные положения работы сформулированы четко, структура работы хорошо продумана. Выводы конкретны и вытекают из сути работы. Оформление диссертации не вызывает особых нареканий, за исключением, разве что, определенного числа опечаток. Работа написана хорошим научным языком, представленные сведения аргументированы, свидетельствуют о хорошей научной подготовке диссертанта.

В целом, работа выполнена на высоком методическом и методологическом уровне, что подтверждается широким спектром

использованных современных методов исследования, адекватных поставленным задачам. Поставленную цель в диссертационной работе следует считать достигнутой благодаря корректной методической основе, полученные результаты, обладающие научной новизной – весьма убедительными, а сформулированные по результатам исследований выводы - аргументированными.

Соответствие автореферата содержанию диссертации

Автореферат диссертации Некрасовой К.А. на тему «Экспериментальное исследование рекомбинантного антитела, блокирующего активацию комплемента, при травматическом повреждении головного мозга» изложен на 25 страницах, оформлен в соответствии с требованиями ГОСТ Р 7.0.11-2011 и достаточно полно отражает основные положения и результаты диссертационного исследования.

Основные замечания и вопросы по диссертационной работе

Замечания к диссертационной работе упомянуты выше, однако они не умаляют общего положительного мнения о диссертации. В плане научной дискуссии хотелось бы получить ответы на следующие вопросы:

1. В обзоре научной литературы автором подробно рассматривается роль избыточной активации системы комплемента при патологических процессах в центральной нервной системе, ингибирование системы комплемента при ишемических инсультах и черепно-мозговой травме в исследованиях *in vivo*, а также приведен краткий обзор ингибиторов комплемента, находящихся в настоящее время в клинической разработке и потенциально эффективных при лечении патологий центральной нервной системы. При этом в обзоре не представлен анализ существующих подходов к фармакотерапии ЧМТ, их достоинств и недостатков, что не позволяет оценить предполагаемую роль разрабатываемого антитела, блокирующего активацию комплемента, в общей картине терапии ЧМТ.

2. Специфическая фармакологическая активность рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 *in vivo* изучалась на примере его аналога – моноклонального антитела 3A8, специфичного С3 компоненту комплемента крысы. Сравнивалась ли эпитопная специфичность этого антитела со специфичностью рекомбинантного антитела hC34?

Высказанные замечания и вопросы не снижают общей положительной оценки диссертационной работы Некрасовой К.А.

Заключение

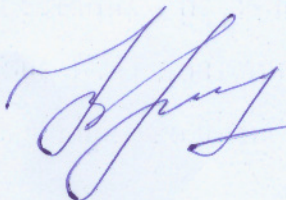
Диссертационная работа Некрасовой Ксении Александровны на тему «Экспериментальное исследование рекомбинантного антитела, блокирующего активацию комплемента, при травматическом повреждении головного мозга», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (биологические науки), является полной, завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основе выполненных автором исследований решена актуальная для современной фармакологии научная проблема - экспериментальное обоснование подхода к лечению травматического повреждения головного мозга.

По актуальности темы и решаемых задач; новизне полученных результатов; объему, методическому и методологическому уровню проведенных исследований, теоретической и научно-практической значимости, полноте их опубликования, перспективному вкладу в разработку новых методов лечения и сохранения здоровья человека, диссертационная работа соответствует критериям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 26.05.2020 г. № 751, от 20.03.2021 г. № 426, от

11.09.2021 г. № 1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Некрасова К.А. достоин присуждения искомой степени по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (биологические науки).

Официальный оппонент
И.о. заведующего кафедрой фармакологии
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»,
доктор биологических наук (специальность 3.3.6. Фармакология,
клиническая фармакология), профессор

«05» декабря 2022 г.

 К.В. Ленская

Подпись доктора биологических наук, профессора К.В. Ленской заверяю.

ЗАМЕСТИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ ГЛАВНОГО
УПРАВЛЕНИЯ ПО ОРГАНИЗАЦИИ
РАБОТЫ С ПЕРСОНАЛОМ



Ленская Е.П.
12.12.2022

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9, тел. +7 (812) 328-20-00, e-mail: spbu@spbu.ru