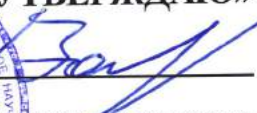


**«УТВЕРЖДАЮ»**  


ВРИО директора Федерального государственного  
бюджетного научного учреждения  
«Федеральный исследовательский центр  
фундаментальной и трансляционной медицины»

Воевода М.И.  
академик РАН, д.м.н., профессор

### **ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

**на диссертационную работу Шаповал Андрея Ивановича**

«Новые костимуляторные молекулы семейства В7 и роль костимуляции в активации NK-клеток», представленной на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.03 – «Молекулярная биология» и 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

#### **Актуальность и научная новизна полученных результатов**

Поиск новых молекул участвующих в регуляции иммунного ответа, а также изучение молекулярных механизмов взаимодействия клеток иммунной системы представляется актуальной задачей при разработке новых стратегий иммунотерапии онкологических и ряда других заболеваний. Открытие новых иммуностропных молекул и исследование их функций является основой для создания новых молекулярных инструментов для манипуляции иммунным ответом при различных патологиях. Наиболее впечатляющие успехи последних лет в терапии онкологии онкологических заболеваний были

достигнуты именно в области иммунотерапии при использовании вариантов направленной регуляции иммунного ответа.

Первые костимуляторные молекулы, которые усиливают или снижают сигнал через Т-клеточный рецептор, были открыты в конце 80-х годов. На основании изучения аминокислотных последовательностей и структуры этих молекул было показано, что они принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов. Позднее эти молекулы были выделены в отдельное семейство В7, по названию первых лигандов В7-1 и В7-2, которые взаимодействуют с рецепторами CTLA-4 и CD28. Экспериментальные данные полученные *in vitro* и *in vivo* показывают, что эти молекулы обладают выраженными костимуляторными свойствами и способны регулировать различные аспекты иммунного ответа. Дальнейшие эксперименты позволили сделать вывод, что эти молекулы могут быть использованы для стимуляции противоопухолевого иммунитета. На основе этих данных были разработаны препараты, которые сегодня используются для иммунотерапии онкологических заболеваний и являются наиболее эффективными препаратами для лечения таких заболеваний. Обнаружение новых костимуляторных молекул и изучение их функций позволит не только понять тонкие механизмы активации и регуляции функций Т-лимфоцитов, но и разработать новые молекулярные инструменты для оптимизации иммунного ответа. В связи с этим цель диссертационной работы Шаповала Андрея Ивановича – поиск новых костимуляторных молекул и исследование их функций в регуляции адаптивного и врожденного иммунного ответа является весьма своевременной и актуальной.

### **Достоверность и обоснованность результатов и выводов**

Описанные в работе исследования проведены с использованием широкого набора современных методов биоинформатики, молекулярной биологии и иммунологии. Полученные результаты проверены и

подтверждены в разных моделях *in vitro* и *in vivo*. Все эксперименты выполнены в достаточном количестве повторов, с использованием адекватного количества лабораторных животных, для сбора и анализа данных применялось специализированное оборудование с современным программным обеспечением. Используемые автором методы позволили решить поставленные задачи, объем проведенных экспериментов позволил получить достоверные результаты, на которых базируются все сделанные в диссертационной работе выводы.

Основные результаты работы опубликованы в 21 статье в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Результаты, представленные в статьях автора, цитировались в более чем в трех тысячах статей, что также подтверждает актуальность темы диссертации и достоверность полученных автором результатов.

### **Общая характеристика работы**

Диссертационная работа Шаповала Андрея Ивановича состоит из нескольких разделов. Титульный лист оформлен в соответствии с требованиями ВАК. Далее следует «Оглавление» и «Сокращения». Во «Введении» представлены актуальность темы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, а также сформулированы ее цели, задачи и основные положения, выносимые на защиту. В первой главе «Обзор литературы» описана молекулярная структура, биологическая активность и терапевтическое применение молекул семейства В7, а также роль костимуляторных молекул в регуляции клеток врожденного иммунитета. Стоит отметить общую линию описания каждой молекулы семейства В7 в рамках «Идентификация- экспрессия – функция – терапевтическое использование». Такой подход задает общую логику исследования – от поиска новой молекулы через её характеристику к

терапевтическому использованию. Именно такой подход автор использовал в дальнейшем и в своей исследовательской работе.

Вторая глава «Материалы и методы» посвящена биологическому материалу, приборам, реактивам, основным методам исследований и экспериментам. В работе использован широкий спектр современных методов – от биоинформатики до молекулярной и клеточной биологии с применением адекватных приборов и инструментов.

В третьей главе «Результаты» описаны полученные автором экспериментальные данные. В четвертой главе «Обсуждение результатов» представлена интерпретация результатов и анализ полученных данных. В конце работы приведены «Выводы», «Перспективы и практические рекомендации» и «Список литературы». Диссертация изложена на 219 страницах, включает в себя 4 таблицы и 44 рисунка. Список цитируемой литературы состоит из 319 источников, из них 2 отечественные и 317 иностранные.

Глава «Результаты», в которой непосредственно представлены результаты экспериментальных исследований состоит из 32 подразделов. В начале этой главы, в разделах 3.1 – 3.15, содержатся данные о клонировании и функциональной активности В7-Н3 молекулы. Описаны экспрессия В7-Н3 в органах, тканях и клетках человека, эффект В7-Н3 на цитотоксические Т-лимфоциты и продукцию цитокинов, исследована экспрессия, пока еще не известного, рецептора В7-Н3.

**Замечания к методам анализа экспрессии.** В ходе анализа экспрессии мРНК автором был использован единственный референс-ген GAPDH, о котором в тексте (диссертация -стр. 127, автореферат – стр. 26), упомянуто как о «гене экспрессирующемся на постоянном уровне во всех клетках», что не соответствует действительности с учетом множественных (более 60) псевдогенов GAPDH, экспрессия которых значительно варьирует. Этот факт может исказить реальные данные об экспрессии изучаемых новых молекул в органах и тканях. Анализ экспрессии белка В7-Н3 проводился с

использованием сывороток, полученных путем иммунизации мышей гидрофильным пептидом из внеклеточной части молекулы В7-Н3 (стр. 14 автореферата, стр. 104 диссертации), однако в диссертации не детализированы эксперименты по доказательству специфичности используемых сывороток, по отсутствию кросс-реакции с другими белками. Важный вопрос о специфичности данных сывороток остается открытым.

Заметное место в диссертационной работе занимают исследование функций В7-Н3 в регуляции противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* и *in vivo*, на мышинных моделях. Эти эксперименты позволили сделать автору обоснованные предположения о возможном терапевтическом использовании обнаруженных автором молекул-мишеней.

В разделах 3.16 – 3.22 речь идет об исследовании иммунологических функций молекулы семейства бутирофилинов BTNL8 (Butyrophilin-like 8). Исследована экспрессия мРНК, кодирующей разные изоформы BTNL8, проведен анализ экспрессии рецептора для BTNL8. Показано, что BTNL8 усиливает пролиферацию и продукцию цитокинов Т-лимфоцитами *in vitro*. Важным наблюдением является то, что BTNL8 усиливает первичный, но не вторичный иммунный ответ.

Несомненным достоинством работы является установление молекулярных механизмов регуляции натурального иммунного ответа, описанных в разделах 3.23 – 3.32. Автором продемонстрировано, что для оптимальной активации НК-клеток требуются костимуляторные молекулы. Существенную роль в активации НК-клеток играет молекула 4-1ВВ, которая представлена на поверхности  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов. Показано, что препараты бисфосфонатов, которые вызывают активацию  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов значительно усиливают прямую и антителозависимую цитотоксичность НК-клеток, этот феномен обусловлен увеличением экспрессии 4-1ВВ на  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитах.

Необходимо подчеркнуть, что результаты, полученные автором, носят не только исследовательский характер, а имеют практическое значение, являясь основой для разработки новых протоколов терапии онкологических

заболеваний с использованием вновь открытых костимуляторных молекул. Проводимые в настоящее время 11 клинических испытаний, в которых используются молекулы В7-Н3, безусловно, очень серьезный шаг по направлению к практическому использованию открытых автором новых молекул.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертационной работы, которая по своей структуре и техническому оформлению соответствует требованиям ВАК.

### **Заключение**

По объему, уровню выполнения, качеству проведенных исследований, актуальности, высокой научной и практической новизны полученных результатов диссертационная работа Шаповала А.И. является завершенным научно-квалификационным исследованием, совокупность теоретических положений которого можно квалифицировать как новое крупное достижение в расширении наших представлений о роли костимуляторных молекул в регуляции иммунного ответа. В ходе работы открыты новые регуляторные молекулы, которые могут быть использованы для получения новых лекарственных препаратов. Фундаментальные знания, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, характеризуют молекулярные и клеточные механизмы регуляции иммунитета, а также создают методологическую базу для создания новых лекарственных средств на основе манипуляции костимуляторными молекулам. Подтверждением значимости полученных результатов являются публикации автора в ведущих международных журналах Nature Medicine и Nature Immunology.

Таким образом, представленная диссертационная работа Шаповала А.И. «Новые костимуляторные молекулы семейства В7 и роль костимуляции в активации НК-клеток» полностью соответствует требованиям ВАК РФ к

диссертациям на соискание ученой степени доктора наук в п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» от 24.09.2013 №842 с изменениями от 21.04.2016 №335. Автор диссертации, Шаповал Андрей Иванович, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.03 – «Молекулярная биология» и 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

Отзыв на диссертационную работу Андрея Ивановича Шаповала подготовлен доктором биологических наук Сергеем Петровичем Коваленко, обсужден и утвержден на заседании межлабораторного семинара отдела экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний ФИЦ ФТМ (протокол №8 от 22 мая 2019 года).

Сергей Петрович Коваленко, д.б.н.,

  
Заведующий лабораторией

молекулярной генетики ФИЦ ФТМ

Личную подпись *Коваленко С.П.*  
**Заверяю** *Менеева О.И.*  
Начальник отдела кадров  
31 05 2019 г.

