

Отзыв

официального оппонента на диссертацию Шаповала А. И. на тему «Новые костимуляторные молекулы семейства B7 и роль костимуляции в активации NK-клеток», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология» и 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

Актуальность выбранной темы

Актуальность борьбы с онкологическими заболеваниями не вызывает сомнений. Согласно данным представленными Всемирной организацией здравоохранения онкологические заболевания являются второй из основных причин смерти в мире и отмечается постоянный рост заболеваемости и смертности от этой патологии. Злокачественные опухоли становится причиной практически каждой шестой смерти в мире. Современные методы иммунотерапии онкологических заболеваний доказали эффективность этого подхода для лечения разных опухолей. В 2018 году Нобелевскую премию по медицине присудили за разработку новых подходов для иммунотерапии злокачественных опухолей, которые используют молекулы семейства B7 в качестве мишеней. Однако, выражаясь образно, сила нашего действия равна силе противодействия и уже даже такие успехи от иммунотерапии, которые достигнуты к настоящему времени являются неудовлетворительными. В диссертации представлены данные, которые развивают тему молекул семейства B7, и других костимуляторных молекул, для регуляции противоопухолевого иммунного ответа, что подчеркивает актуальность темы диссертации.

Представленная диссертационная работа посвящена одной из актуальных проблем современной молекулярной иммунологии - изучению роли костимуляторных молекул в регуляции клеток иммунного ответа. В частности, в диссертации представлены результаты изучения молекулярных взаимодействий между различными типами клеток, которые обеспечивают развитие и стимуляцию иммунного ответа (костимуляторные лиганды семейства B7). В работе впервые описаны иммунологические свойства двух новых молекул (костимуляторная молекула B7-H3 и молекула семейства бутирофилинов BTN8 (Butyrophilin-like 8), которые играют важную роль в регуляции иммунного ответа. В диссертации также представлены результаты, которые показывают, что костимуляторные молекулы участвуют в активации клеток естественного иммунитета натуральных киллеров. Результаты представленные в диссертационной работа имеют важное

значение для разработки новых стратегий иммунотерапии онкологических заболеваний.

Соответствие темы диссертации научной специальности

Тема диссертационного исследования посвящена изучению новых костимуляторных молекул семейства B7 (B7-H3 и BTL8) и роли костимуляции в активации НК-клеток. В диссертации исследованы молекулярные и клеточные механизмы регуляции иммунного ответа. Работа выполнена с применением современных разнообразных методов молекулярной биологии, а именно: работа с клеточными линиями, клонирование ДНК, конструирование рекомбинантных плазмид, очистка рекомбинантных плазмид; экспрессия рекомбинантных генов *in vitro* с использованием эукариотических клеток; анализ РНК с помощью нозерн-блотинга; полимеразная цепная реакция в реальном времени; анализ белков с помощью вестерн-блотинга; работа с лабораторными животными. Таким образом тематика диссертации полностью соответствует паспортам ВАК заявленных специальностей: 03.01.03 – «Молекулярная биология», а именно пункты № 4 Молекулярная биология клетки, № 7 Генная, белковая и клеточная инженерия и № 8 Биоинформатика; 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология» Фундаментальные исследования, посвященные изучению строения, функционирования иммунной системы и механизмов иммунной защиты (биологические науки).

Основные результаты диссертационной работы

В диссертации описаны функции двух новых костимуляторных молекул (B7-H3 и BTL8). В ходе выполнения работы созданы рекомбинантные химерные белки и клеточные линии, которые были использованы для изучения функциональной активности обнаруженных молекул. Было доказано участие этих молекул в регуляции иммунного ответа.

Продемонстрирована роль обнаруженных молекул в регуляции иммунного ответа *in vitro* и *in vivo*. Автором изучены экспрессия обнаруженных молекул в разных тканях человека. Были созданы рекомбинантные химерные белки для исследования экспрессии потенциальных рецепторов и функциональной активности B7-H3 и BTL8.

Установлено, что костимуляторные молекулы играют важную роль во взаимодействии клеток естественного иммунного ответа, таких как гамма/дельта Т-лимфоцитов и НК-клеток. Было показано, что препараты

стимулирующее гамма/дельта Т-лимфоциты также приводят к активации антитело-зависимой цитотоксичности.

Достоверность полученных результатов

Работа выполнена с использованием современных методов биоинформатики, молекулярной биологии и иммунологии. В работе были использованы методы поиска гомологичных нуклеотидных последовательностей в базах данных, ИФА, ПЦР, проточной цитометрии, Т-клеточной пролиферации, цитотоксичности. Полученные автором экспериментальные данные обработаны с применением адекватных статистических методов, которые подтверждают достоверность полученных результатов. Также достоверность полученных результатов подтверждена множественными публикациями, которые вышли после публикации оригинальных результатов автора.

Научная новизна

Обнаружена новая костимуляторная молекула В7-Н3 (В7 Homolog 3), которая принадлежит к семейству В7, выяснена ее функциональная активность. В ходе выполнения работы созданы рекомбинантные химерные белки и клеточные линии, которые были использованы для изучения функциональной активности В7-Н3. Впервые показано, что В7-Н3 взаимодействует с Т-лимфоцитами, вызывает усиленную продукцию IFN- γ , и как следствие этого, активирует цитотоксические CD8 Т-лимфоциты. В7-Н3 активирует противоопухолевый иммунитет и вызывает генерацию иммунологической памяти против опухоли.

Впервые продемонстрирована роль молекулы BTNL8 (Butyrophilin-like 8), принадлежащей к семейству бутирофилинов, в регуляции иммунного ответа. Выявлено взаимодействие внеклеточной части молекулы BTNL8 с Т-лимфоцитами. В экспериментах *in vivo* показано, что BTNL8 может стимулировать первичный иммунный ответ.

Впервые показано, что для оптимальной активации НК-клеток необходимы два сигнала. Первым сигналом является взаимодействие иммуноглобулинов с Fc-рецептором, второй сигнал доставляется внутрь клетки через костимуляторные молекулы. $\gamma\delta$ Т-лимфоциты экспрессируют CD137L (4-1BBL) молекулу (из семейства TNF), которая играет важную роль в костимуляции НК-клеток. CD137L усиливает экспрессию NKG2D рецептора, который опосредует цитотоксическую активность НК-клеток. Бисфосфонаты, которые применяются для терапии онкологических заболеваний, индуцируют активацию $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, увеличивают

экспрессию CD137L, что приводит к усилению прямой и антителозависимой цитотоксичности NK-клеток против опухолей.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость работы обусловлена тем, что в ней описаны две новые костимуляторные молекулы B7-H3 и BTNЛ8 с уникальными свойствами, расширяющими наши представления об участии костимуляторных молекул в регуляции иммунного ответа. Так, описаны особенности экспрессии новых костимуляторных молекул в различных органах и тканях человека. Определена экспрессия предполагаемых рецепторов на Т-лимфоцитах, взаимодействующих с новыми костимуляторными лигандами, представленными на АПК. Предложено использовать рекомбинантные химерные белки, содержащие внеклеточную часть костимуляторных молекул, для регуляции иммунного ответа. Выявлено, что B7-H3 и BTNЛ8 играют ключевую роль в активации противоопухолевого антиген-специфического ответа.

Результаты работы позволили предложить модель для улучшения существующих методов иммунотерапии онкологических заболеваний. Комбинирование опухолеспецифических МАТ, которые взаимодействуют с Fc-рецептором на NK-клетках (Цетуксимаб и Ритуксимаб), и агентов, активирующих $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, применяемых в клиниках, такие как, Зомета (Zometa), может улучшить иммунотерапию рака через активацию адаптивного и естественного иммунитета.

Практическая значимость работы

В настоящее время проводятся 11 клинических испытаний, спонсированных компанией MacroGenics (США), где МАТ против B7-H3 используются в качестве монотерапии или в комбинации с другими МАТ (Ипилимумаб/анти-CTLA-4 и Пембролизумаб/анти-PD-1) для терапии рака простаты, поджелудочной железы, яичника, желудка, рака легкого и др.

Результаты диссертационной работы могут быть использованы для разработки клинического протокола по применению комбинации Зометы и МАТ (Цетуксимаб и Ритуксимаб) для терапии лимфомы и плоскоклеточной карциномы головы и шеи. Кроме того, возможно использование рекомбинантных химерных белков костимуляторных молекул для повышения эффективности существующих вакцин против инфекций и онкологических заболеваний.

Общая характеристика диссертационной работы

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов исследований, обсуждения результатов и списка литературы, заключения. Диссертация изложена на 217 страницах, включает в себя 4 таблицы и 44 рисунка. Список цитируемой литературы состоит из 319 источников, из них 2 отечественные и 317 иностранные.

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, отмечена новизна исследования, практическая значимость. Актуальность обусловлена растущей заболеваемостью злокачественными новообразованиями и неудовлетворительными результатами лечения, появлением современных способов иммунотерапии.

В главе 1 представлен обзор литературных источников и результатов научных исследований по данной проблеме за последние 5 лет. Подробно представлены фундаментальные характеристики костимулирующих факторов, по сути описана молекулярная анатомия кофакторных систем семейства В7, бутирофилинов, костимуляция киллерных клеток. Подробное описание приводит к логичной формулировке цели и задач.

Во второй главе представлена характеристика методов исследования. Представленный клинический материал является достаточным для корректной статистической обработки и представления полученных выводов. Все представленные методы исследования являются современными и высокоинформативными. Подробно описаны все клеточные и субклеточные этапы пробоподготовки и основных процессов по трансфекции эукариотических клеточных линий рекомбинантными, процессы получения стабильных клонов опухолевых клеток и других процессов, коих использовано не менее 22 методик. Полученные результаты и выводы, научно обоснованы и достоверны, статистическая обработка данных проводилась с помощью серьезных компьютерных программ.

В главе 3 автор оценил результаты собственных исследований. Доказательно показано, что В7-Н3 относятся к семейству молекул В7. Кроме того показано, что В7-Н3 кодируется мРНК размером 4,1-кб и экспрессируется

во многих тканях человека, включая сердце, печень, плаценту, простату, семенники, матку, поджелудочную железу, тонкий и толстый отделы кишечника, головном мозге, скелетных мышцах, почках и легких. В ходе экспериментов было показано, что B7-H3 экспрессируется на поверхности дендритных клеток, моноцитов и Т-лимфоцитов только после их активации, а их экспрессия является временной на ранних сроках активации Т-лимфоцитов. Молекула же B7-H3 костимулирует Т-клеточный иммунный ответ, селективно индуцирует продукцию IFN- γ , что в итоге приводит к формированию стабильных клонов Р815 опухоли и стимулирует деление опухолеспецифических ЦТЛ в лимфоидных органах, что может приводить к усилению противоопухолевого иммунного ответа. Было так же показано, что костимуляция Т-клеточной пролиферации происходит с BTN18 молекулой с увеличением продукции цитокинов и, соответственно, усиливает первичный гуморальный ответ. Обоснована и четко обрисована костимуляция натурального иммунного ответа с усилением прямой цитотоксической активности NK-клеток против различных опухолевых линий. Определена роль CD137 и CD137L взаимодействия в активации NK-клеток. Очень интересным образом оценен эффект препаратов, применяемых в клиниках на активацию NK-клеток: их применение приводило к заметному увеличению экспрессии CD69 на NK-клетках и заметно активировало NK-клетки с заметным усилением цитотоксичности.

В главе обсуждение результатов, автор сопоставляет полученные данные с мировыми достижениями в этой области, что еще более подчеркивает всю новизну и важность проведенного автором исследования.

Представленные выводы логически вытекают из исследования и отражают основные его положения, дают ответы на сформулированные задачи и позволили достичь поставленной цели.

Соответствие автореферата содержанию диссертации. Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации, оформлен в соответствии с требованиями п. 25 Положения о присуждении ученых степеней.

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертации нет. Материалы диссертации изложены последовательно, в полном соответствии с поставленными задачами. Решение всех задач, аргументированность и обоснованность выводов позволяют считать диссертацию завершённой.

Заключение

Диссертация Шаповала А.И. «Новые костимуляторные молекулы семейства В7 и роль костимуляции в активации NK-клеток» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.03 – «Молекулярная биология» и 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология» является законченной научно-квалифицированной работой, в которой на основании выполненных автором исследований сформулированы теоретические положения и получены экспериментальные данные, которые подтверждают возможность разработки новых терапевтических агентов для лечения онкологических и других заболеваний.

Диссертация полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.03 – «Молекулярная биология» и 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

Официальный оппонент:

Официальный оппонент:

Профессор кафедры судебной медицины имени профессора В.Н. Крюкова и патологической анатомии с курсом ДПО Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор медицинских наук

« 6 » 05 2019 г.

Ашот Меружанович Авдалян

Подпись заверяю:



656038, Российская Федерация, Алтайский край, г. Барнаул, проспект Ленина, д. 40.;
телефон: +7(3852) 366-091
сайт: <https://asmu.ru>; e-mail: rector@asmu.ru