

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию А.И. Шаповала на тему

“Новые костимуляторные молекулы семейства В7 и роль костимуляции в активации НК-клеток“, представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук специальности 03.01.03 – “Молекулярная биология“ и 14.03.09 – “Клиническая иммунология, аллергология“

Актуальность темы.

Идея о том, что активация иммунной системы может быть стратегически важным средством для борьбы с опухолями, была высказана еще в начале прошлого века. Однако только в последние четверть века стали раскрываться тайны молекулярных механизмов стимуляции и подавления активности иммунокомпетентных клеток, управление которыми способно обеспечить клинически эффективный противоопухолевый иммунитет. Еще в конце 1980-х были обнаружены первые костимулирующие молекулы, активация которых в качестве второго сигнала была необходима для запуска пролиферации Т клеток, получивших первый сигнал от антиген-специфического рецептора (June et al., 1987; Schwartz et al., 1989; Jenkins et al., 1990). Были описаны первые костимуляторные молекулы будущего семейства В7 (Linsley et al., 1991; Freeman et al., 1993). В эти же годы – начало 90-х - д-р Хоньдзё (Т. Honjo, Япония), а затем и д-р Аллисон (J.P. Allison, США) обнаружили доказательства существования на поверхности Т клеток разных иммунорегуляторных молекул, PD-1 и CTLA-4, соответственно. Оказалось, что блокада этих структур вызывала стимуляцию противоопухолевых Т клеток. За последние четверть века результаты последних исследований были успешно транслированы в клиническую практику, и в прошлом году оба автора были удостоены Нобелевской премии в области физиологии или медицины за “открытие способа лечения рака путем ингибиции негативной иммунной регуляции”. Примерно столько времени – 20-30 лет - реально проходит от открытия до его реализации в практике и признания – практически в любой сфере медицины.

К началу 2000-х годов исследования семейства молекул В7 становятся “золотой жилой” для молекулярных и клеточных иммунологов – одни открытия новых молекул следовали за другими. Исследования, начатые в те годы, активно продолжаются и сейчас – открываются новые стороны взаимодействия уже известных иммунорегуляторных молекул, исследуются варианты воздействий с участием этих молекул для разработки новых методов борьбы с опухолями, другими распространенными тяжелыми заболеваниями. Поскольку диссертационная работа А.И. Шаповала посвящена исследованию свойств открытой им молекулы В7-Н3 – достойного члена семейства В7, а также исследованиям костимулирующих свойств других молекул – бутирофилина-8 и 4-1ВВL (CD137L) – актуальность выбранной темы для сегодняшнего дня не вызывает сомнений. Доказанная за четверть века успешность клинически значимых трансляционных исследований в этой области наглядно демонстрирует, почему выбранное диссертантом направление исследований столь актуально, в первую очередь, для разработки оригинальных и клинически эффективных способов иммунотерапии рака.

Соответствие темы диссертации выбранным научным специальностям

Тема диссертационной работы А.И. Шаповала посвящена изучению иммунологической активности новых молекул, принадлежащих к семейству костимуляторных молекул В7 и раскрытию новых механизмов активации естественных киллерных клеток (НК-клеток). По сути, в диссертации изложены результаты многолетних исследований диссертанта по поиску новых, ранее не изученных клеточных и молекулярных механизмов иммунорегуляции, которые имеют непосредственное отношение к управлению противоопухолевым иммунитетом на уровне активации ключевых клеток такового - Т клеток и НК клеток. Работу отличает высокое разнообразие используемых методов, которые относятся к двум группам методических подходов:

(а) современные молекулярно-биологические методы исследования (генетическое конструирование, клонирование ДНК с последующим биоинформатическим анализом нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, работа с рекомбинантными молекулами ДНК, методы экспрессии рекомбинантных генов в клетках эукариот, полимеразная цепная реакция (ПЦР) с последующим секвенированием, ПЦР в реальном времени, нозерн-блоттинг для анализа РНК, вестерн-блоттинг для анализа белков);

(б) современные методы молекулярной и клеточной иммунологии (сепарация Т клеток, CD3-стимулированная пролиферация Т клеток, блокада оригинальными разработанными рекомбинантными белками – В7Н3Ig, фенотипическая характеристика активированных субпопуляций Т клеток с помощью проточной цитофлуориметрии, иммуноферментный анализ цитокинов, определение активности цитотоксических противоопухолевых Т лимфоцитов *in vitro* и *in vivo* с использованием лабораторных животных – мышей, оценка первичного гуморального иммунного ответа мышей на растворимый антиген, смешанные культуры разных выделенных популяций иммунокомпетентных клеток для оценки взаимодействия клеток, количественная оценка активности НК клеток).

Перечень использованных в диссертации методов, направление экспериментальных исследований, содержание научных исследований диссертанта, изложенное в диссертационной работе, указывают однозначно на то, что тематика диссертации полностью соответствует паспортам, утвержденным ВАК для заявленных специальностей:

03.01.03 – Молекулярная биология (соответствие пунктам 4 Молекулярная биология клетки, пункту 7 Генная, белковая и клеточная инженерия и пункту 8 Биоинформатика;

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология (соответствие разделу Фундаментальные исследования, посвященные изучению строения, функционирования иммунной системы и механизмов иммунной защиты (биологические науки).

Основные результаты диссертационной работы

В диссертационном исследовании изучены молекулы семейства В7. Так, с помощью биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей экспрессированных генов, обнаруженных в антиген-представляющих дендритных клетках человека обнаружена новая молекула, гомологичная молекулам семейства В7, имеющая две белковые изоформы. Подробно описана структура новой молекулы, охарактеризованы сходства и различия с другими молекулами семейства. Представлена характеристика и мышшиной молекулы, получившей название В7-Н3. Подробно исследованы уровни экспрессии В7-Н3 в разных клетках организма человека, в клетках опухолевых линий

человека. Изучены особенности экспрессии молекулы в иммунокомпетентных клетках (активированные Т клетки). Показано функциональное значение молекулы В7-Н3 как костимуляторного механизма, контролирующего уровень Т-клеточного ответа (пролиферация, продукция цитокинов, противоопухолевой иммунитет) на активацию антиген-специфического рецептора Т клетки (CD3).

Диссертационное исследование выявило и другую молекулу семейства В7, используя сходную схему поиска – бутирофилин-подобный-8 (BTNL8), существующую в двух изоформах. Обнаружена новая функция этой молекулы – костимулирование Т клеток, на которых в ходе исследования диссертант выявил рецепторы данной молекулы. Изучены функциональные свойства нового костимуляторного белка, аналогичные исследованному у молекулы В7-Н3.

Другим результатом диссертационной работы явилось открытие значения гамма-дельта Т клеток для активации NK клеток и конкретизация молекулярных механизмов такой активации, а именно – роли CD137L- CD137 лиганд-рецепторного взаимодействия в опосредовании эффекта гамма-дельта Т клеток на NK клетки. Этому способствовали разработанные диссертантом оригинальные рекомбинантные конструкции, использованные в остроумных экспериментах с удалением одной из популяций иммунокомпетентных клеток. В разработанной экспериментальной системе был испытан ряд клинически применяемых фармакологических препаратов противоопухолевого действия и обнаружены новые эффекты препаратов в отношении гамма-дельта Т клеток, усиливающих антителозависимой цитотоксической активности NK клеток.

Достоверность полученных результатов

Использование разнообразного набора современных методов молекулярной биологии, биоинформатики и высокоинформативных количественных методов молекулярной и клеточной иммунологии, перечисленных выше, в сочетании с самым современным, адекватным характеру исследований статистическим аппаратом обеспечили высокую достоверность полученных результатов. Однонаправленный характер результатов при повторениях собственных экспериментов, а главное – серия статей других авторов, подтверждающих результаты пионерских исследований диссертанта на протяжении последних лет, являются лучшим доказательством достоверности полученных основных результатов оппонированной докторской диссертации.

Научная новизна

Автор диссертационного исследования был первым, кто не только обнаружил новую молекулу семейства В7, впоследствии получившую название В7-Н3, но и экспериментально доказал наличие спектра биологической активности молекулы, характеризующей ее как иммуностимуляторную. Доказательные эксперименты с использованием оценки пролиферативной и цитокин-продуцирующей функции Т клеток, активности цитотоксических CD8+ Т клеток, стимуляции первичного и вторичного противоопухолевого иммунитета, проведенные диссертантом, обосновали разнообразие проявлений костимуляторной способности В7-Н3. Именно новизна и высокая доказательность этих исследований, результаты которых были опубликованы в мировых журналах с высоким импакт-фактором, внесли существенный вклад в привлечение внимания других исследователей к перспективным молекулам семейства В7, результатом чего явились открытия других В7 молекул. Таким образом, исследования А.И. Шаповала привели не только к получению собственных новых данных (В7-Н3), но и способствовали

генерации целой линейки новых знаний при открытии существования других, ранее неизвестных молекул семейства В7.

Автор исследования был также первым, кто обратил внимание на оказавшуюся гомологичной В7 молекулам молекулу бутирофилина-аналога-8 (BTNL8) и получил новые данные о костимуляторной роли внеклеточного домена этой молекулы во взаимодействии с Т клетками. Впервые была продемонстрирована способность BTNL8 вносить существенный вклад в стимуляцию первичного (но не вторичного) гуморального IgG-иммунного ответа на белковый антиген.

Новизной отличаются и данные, представленные в диссертационной работе, доказывающие двухсигнальную концепцию активации NK клеток, согласно которой взаимодействие антител с Fc рецептором на клеточной поверхности обеспечивает лишь первый сигнал, тогда как гамма-дельта Т клетки, экспрессирующие CD137 лиганд, костимулируют NK клетки посредством CD137L-CD137 взаимодействия. Впервые показано, что противоопухолевые препараты-бифосфонаты, увеличивая экспрессию CD137L, усиливают прямую и антителозависимую цитотоксичность NK клеток в отношении злокачественных клеток, тормозя опухолевый рост помисо своего прямого противоопухолевого действия.

Таким образом, в ходе исследования в рамках выбранной темы, диссертанту удалось открыть новые молекулы семейства В7 (В7-Н3 и BTNL8), описать их свойства, связав их с потенциалом будущего использования в медицине, а также установить принципиально новые, ранее не описанные молекулярные механизмы регуляции реакций адаптивного иммунитета (значение BTNL8) и врожденного иммунитета (роль CD137L-CD137 во взаимодействии гамма-дельта Т клеток-NK клеток, реализующем костимуляторные свойства гамма-дельта Т клеток).

О новизне и высоком уровне полученных результатов свидетельствуют и публикации результатов диссертационного исследования диссертанта в ведущих мировых журналах по специальностям, избранным диссертантом. Для примера взята статистика публикаций пяти наиболее высокоцитируемых работ диссертанта в журналах с импакт факторами 6 – 29 (Chapoval A.I.) (<https://publons.com/researcher/1749808/andrei-chapoval/>) :

Nature Medicine (WoS Q1, 240 цитирований),

Immunity (WoS Q1, 419 цитирований),

Nature Immunology (WoS Q1, 459 цитирований),

Journals of Clinical Investigation (WoS Q1, 208 цитирований),

Journal of Immunology (WoS Q1, 267 цитирований)

Общая статистика по базе JCR(WoS): 58 публикаций, 3018 цитирований, индекс Хирша 20. Анализ цитирований показывает, что в большинстве случаев – это работы, в которых другие авторы пошли по пути, проложенном диссертантом, в том числе - при дальнейшем изучении новых костимуляторных молекул, открытых диссертантом.

Теоретическая значимость работы

Теоретическое значение данного исследования и полученных результатов определяется впервые описанными структурными и функциональными свойствами новых костимуляторных молекул В7-Н3 и BTNL8, т.е. получением новых знаний о

многообразии путей костимуляции посредством мембраноассоциированных доменов при активации иммунокомпетентных клеток сигналами первого порядка (антиген – для Т клеток, антитела – для NK клеток). Полученные результаты проясняют молекулярные механизмы противоопухолевого иммунитета, определяя место для молекул В7-Н3 и ВТNL8. Фундаментальные исследования диссертанта, приведшие к открытию ранее неизвестных молекул со способностью к костимуляции при воздействии на клетки иммунной системы, привели, вместе с работами других авторов, в том числе – лауреатов Нобелевской премии, к генерации новых фундаментальных знаний в данной области – области познания механизмов регуляции иммунного ответа в норме и при патологии человека. Открытие А.И. Шаповалом новой костимуляторной молекулы семейства В7 – В7-Н3, а также теоретическое и экспериментальное обоснование им того, что молекула ВТNL8 также имеет обладает подобными костимуляторными свойствами – следует несомненно квалифицировать как важные научные достижения, разработанные соискателем, и позже нашедшие подтверждения в работах других авторов.

Практическая значимость диссертационного исследования

Прежде всего, практическая значимость работы заключается в открытии новых потенциальных мишеней для воздействий – молекул семейства В7. В последних обзорах, посвященных исключительно предмету, открытому диссертантам - молекулам В7-Н3, представлены самые последние результаты зарубежных исследований, свидетельствующие о про-опухолевой активности молекул, способствующих инвазии, пролиферации, метастазированию опухолевых клеток, резистентности к противоопухолевым лекарствам, усилению гликолиза под влиянием данных молекул, что обосновывает роль В7-Н3 как как биомаркеров прогноза и как потециальной мишени ингибирующих воздействий при онкотерапии (Castellanos et al., 2017; Flem-Karlsen et al., 2019), в том числе – при лечении опухолей костной системы (He, Le, 2019). Сегодня уже проводится более десятка клинических испытаний, в которых используют в качестве терапевтического агента моноклональные антитела против молекулы В7-Н3 (пембролизумаб, ипилимумаб) для лечения различных форм рака.

Как и В7-Н3, ВТNL8 тоже несет потенциал стать новой мишенью – с целью усиления или подавления иммунных реакций при иммунокомпрометации или аутоиммунных заболеваниях, соответственно (Amett, Viney, 2014). Обе молекулы открытых диссертантов В7 гомологов могут быть использованы для разработки кандидатных препаратов рекомбинантных костимулирующих с целью иммуностимуляции при инфекционных заболеваниях при иммунокомпрометации, в том числе – при онкологических заболеваниях. Такая проблема особенно остро стоит в детской гематологии при иммунокомпрометации детей с лейкозом в результате использования длительной химиотерапии и аллотрансплантации костного мозга.

Обнаруженные диссертантом механизмы активации NK клеток, требующие участия гамма-дельта Т лимфоцитов в качестве второго сигнала при их стимуляции, могут быть использованы для продолжения исследований диссертанта по активации этого пути лекарственными препаратами-бифосфанатами. Такие исследования несут высокий потенциал разработки новых тест-систем, аналогичных использованным диссертантом в своем исследовании, для персонализации использования бифосфонатов при лечении некоторых форм онкологических заболеваний, основываясь на изученной диссертантом способности препаратов-бифосфонатов усиливать костимуляторное действие гамма-дельта Т лимфоцитов на NK клетки.

Общая характеристика диссертационной работы

Работа оформлена традиционна и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования и использованных материалов. В отдельных разделах изложены результаты исследования и обсуждение полученных результатов. Объем диссертации – 217 страниц, она содержит 44 рисунка и 4 таблицы. Цитируемая литература – 319 источников, из них только 2 отечественных источников и 317 иностранных источников.

Введение обосновывает актуальность темы, выбранной диссертантом, представлены характеристика новизны исследования и потенциала практической значимости.

В главе 1 обсуждаются данные зарубежных исследований по тематике диссертационной работы, в основном включены данные последнего 5-летнего периода, что характерно для этой быстро растущей области знаний. Описаны существующие костимулятрные молекулы, преимущественно – семейства В7 и бутирофилинов. Отдельно представлены имеющиеся в литературе данные, описывающие молекулы, контролирующие активацию естественных киллерных клеток (NK клеток).

Вторая глава – описание методов исследования, статистической обработки данных, подготовки образцов для исследования. Подробно описаны генетические и биоинформатические методы и методы получения рекомбинантных молекул, методы молекулярных исследований, иммунологические методы. Очень большое разнообразие методов, их тщательное описание и правильное применение в работе обеспечили высокое качество проведенных исследований в рамках темы диссертации.

Глава 3 – описание полученных результатов, основная глава работы, в которой подробно описаны все этапы работы по открытию новых молекул семейства В7, экспрессии мРНК в клетках разных органов человека включая популяции иммунокомпетентных клеток – дендритные клетки, моноциты, Т клетки (неактивированные и активированные). Представленные экспериментальные данные, которые легли в основу выводов диссертации. Все данные адекватно статистически обработаны, значимость различий указана в каждом случае ее наличия и не вызывает сомнений. Накопление доказательной базы и использование разнообразные тест-систем оценки костимуляторных воздействий адекватны задачам исследования, соответствуют внутренней логике диссертационной работы.

В главе “Обсуждение результатов” полученные данные аккуратно и конкретно сопоставляются с данными других исследователей; это удачно выделяет новизну полученных диссертантом результатов. Выводы диссертационной работы полностью соответствуют проведенному исследованию, базируются на солидном экспериментальном материале, отражают полностью задачи исследования, ясно показывая, что конечная цель диссертационного исследования достигнута полностью.

Анализ содержания Автореферата диссертации паоказывает, что он полностью соответствует содержанию всей диссертации, отражая адекватно логику исследования, содержит те же выводы. Оформление Автореферата соответствует требованиям, содержащимся в пункте 25 Положения о присуждении ученых степеней ВАК.

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертации нет. Однако обращает внимание малое количество ссылок на работы отечественных авторов.

Понятно, что исследования, проводимые диссертантом – действительно пионерские, соответствуют самому высокому мировому уровню, однако а конце 1980-х годах в отечественной печати уже были единичные отечественные обзорные работы по зарубежным исследованиям первых костимуляторных молекул (например, LFA-3-CD28), которые могли бы быть процитированы в данной диссертации. Материалы диссертации изложены последовательно, соответствуют поставленным задачам. Получение новых данных лично автором у оппонента сомнений не вызывает. Это подтверждается многочисленными зарубежными конференциями, в которых участвовал диссертант, докладывая с успехом результаты своих исследований.

Строгая аргументированность, новизна выводов диссертационной работы, обоснованность которых доказывается на большом статистически обработанном материале, позволяют считать диссертацию завершённой. Следует отметить, что новые данные о расширении семейства костимуляторных молекул В7 значительно способствовали развитию всего направления по изучению и практическому применению костимуляторных молекул в мировой науке, а А.И. Шаповал действительно внес существенный вклад в развитие этого перспективного направления, находящегося на стыке молекулярной биологии и иммунологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа А.И. Шаповала на тему “Новые костимуляторные молекулы семейства В7 и роль костимуляции в активации НК-клеток“, представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.03 – “Молекулярная биология“ и 14.03.09 – “Клиническая иммунология, аллергология“, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований сформулированы теоретические положения и получены новые экспериментальные данные о значении костимуляторных молекул в осуществлении регуляторных взаимодействий в иммунной системе. Полученные результаты позволяют решить задачу разработки новых лечебных и профилактических препаратов для лечения онкологических и иммуно-ассоциированных заболеваний - на основе разработанных соискателем костимуляторных молекул, в том числе – открытых им лично. Предложенные соискателем технологические решения проблемы эффективной иммуномодуляции при лечении онкологических заболеваний и аутоиммунных заболеваний с использованием новых костимуляторных молекул имеют существенное значение для развития высокотехнологичной медицины в нашей стране и соответствуют как п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, так и пункту 20 Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации в части “переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения... “ (подпункт “в”).

Таким образом, оппонлируемая 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:

Заведующий лабораторией и главный научный сотрудник
лаборатории молекулярных механизмов критических состояний

Научно-исследовательского института общей реаниматологии

имени В.А. Неговского ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр
реаниматологии и реабилитологии Министерства образования и науки Российской
Федерации,

доктор медицинских наук, профессор

Владимир Митрофанович Писарев

“ 31 “ мая 2019 г.

Подпись Писарева Владимира Митрофановича, заведующего лабораторией
молекулярных механизмов критических состояний НИИОР ФНКЦ РР, заверяю:

Ученый секретарь НИИ общей реаниматологии ФНКЦ РР,

Засл. деятель науки РФ, д.м.н., профессор

В.Т. Долгих

107031 Российская Федерация, Москва, Петровка, 25, строение 2.

Тел. +7 (495) 694 27 08

Сайт: <https://fnkcr.ru> e-mail: vpisarev@fnkcr.ru +7 (495) 910 457 19 58

