

ОТЗЫВ официального оппонента  
на диссертацию **Шаповала Андрея Ивановича**  
**НОВЫЕ КОСТИМУЛЯТОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ**  
**СЕМЕЙСТВА V7 И РОЛЬ КОСТИМУЛЯЦИИ В АКТИВАЦИИ НК-КЛЕТОК,**  
представленную  
на соискание учёной степени доктора биологических наук  
по специальностям 03.01.03 – молекулярная биология  
и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

**Актуальность исследования.** Развитие иммунного ответа происходит в ходе тесного взаимодействия клеток иммунной системы. Функциональная роль основных клеточных элементов иммунной системы определяется экспрессируемыми поверхностными рецепторами и секретируемыми цитокинами. Помимо ключевых молекул, таких как TCR, BCR, а также молекулы МНС I и II класса, важную роль в осуществлении эффекторных функций иммунных клеток играют вспомогательные рецепторы, называемые иммунорегуляторными или костимулирующими. Баланс разнонаправленных сигналов от поверхностных рецепторов в той или иной клетке определяет ее функциональное состояние и направление дифференцировки. Изучение механизмов иммунной регуляции имеет первостепенное значение для понимания принципов функционирования иммунитета и служит основой для разработки методов коррекции иммунного ответа при различных патологических процессах. Диссертационная работа А.В.Шаповала посвящена поиску и изучению ранее неизвестных костимулирующих рецепторов клеток иммунной системы. В современной иммунологии это направление относится к наиболее актуальным.

**Структура и оформление диссертации.** Работа написана по классической схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения результатов, обсуждения, выводов и списка цитированной литературы (всего 319 литературных источников). Работа изложена на 219 страницах, содержит 44 рисунка и 4 таблицы. Во «Введении» кратко охарактеризована актуальность темы исследования,

обозначены проблемы и сформулированы цели и задачи. «Обзор литературы» объясняет понятие костимулирующих рецепторов и суммирует сведения о В7-семействе рецепторов. В обзоре подробно описываются все известные члены В7 семейства, а также родственного ему семейства бутирофилинов (BTN). Некоторое внимание уделяется вопросам регуляции функциональной активности НК-клеток. В заключении обзора автор представляет свое видение нерешенных проблем и направления дальнейших исследований. В целом, представленный в обзоре материал достаточно хорошо отражает современное состояние проблемы. Однако, с учетом того, что эксперименты с НК-клетками представляют собой существенную часть диссертации, раздел обзора по НК-клеткам выглядит слишком схематичным. Для решения поставленных задач автор использовал широкий спектр современных экспериментальных и биоинформационных методов. Их подробное описание представлено в главе «Материалы и методы». Глава убедительно демонстрирует высокий методический уровень работы. В разделе «Результаты» представлены экспериментальные данные, которые логично скомпонованы и проиллюстрированы. Глава «Обсуждение» представляет собой авторскую интерпретацию полученных данных в контексте современных знаний о природе костимулирующих рецепторов, их роли в регуляции цитотоксических клеток и возможности их использования для терапии онкологических заболеваний. Заключающие диссертацию «Выводы» соответствуют поставленным задачам. Автореферат соответствует диссертации. Таким образом, оформление диссертации не вызывает серьезных нареканий.

### **Научная новизна, теоретическая и практическая значимость.**

Рецепторы семейства В7 и их лиганды в силу своих иммунорегуляторных свойств относятся к числу приоритетных мишеней для терапии онкологических заболеваний и ряда патологий иммунной системы. Работа А.И.Шаповала внесла важный вклад в исследования этого семейства. Прежде всего, были впервые идентифицированы новые члены В7-семейства: В7-Н3 и BTNЛ8. Последний относится к семейству бутирофилинов, которое можно рассматривать как подгруппу В7-семейства. Были изучены структура генов В7-Н3 и BTNЛ8, клонированы кДНК различных изоформ, возникающих в



результате альтернативного сплайсинга, исследован тканевой и клеточный паттерны экспрессии этих генов на уровне мРНК.

Изучение функциональной активности В7-Н3 показало, что этот поверхностный белок является лигандом неизвестного рецептора на CD8<sup>+</sup> Т-клетках и при взаимодействии с последними способен вызывать их пролиферацию и многократное увеличение синтеза INF $\gamma$ . Что особенно интересно, оказалось, что экспрессия В7-Н3 на опухолевых клетках способствует их отторжению и формированию долговременной иммунологической памяти к опухолевым антигенам.

Исследование BTNL8 продемонстрировало, что этот белок также оказывает костимулирующее действие на Т-лимфоциты, что приводит к их пролиферации и увеличению синтеза цитокинов, таких как INF- $\gamma$ , IL-8, IL-10 и TNF- $\alpha$ . В экспериментах *in vivo* было обнаружено, что введение рекомбинантного BTNL8 в виде химеры его внеклеточной области с Fc-фрагментом иммуноглобулинов существенно стимулировало первичный иммунный ответ на овальбумин. Хотя функциональный смысл этого эффекта и его механизм остаются неизвестными, полученные данные подтверждают иммунорегуляторные свойства BTNL8.

Целый ряд новых данных был получен также при изучении эффектов костимуляции на еще одной популяции цитотоксических лимфоцитов - NK-клетках. Было впервые обнаружено, что  $\gamma\delta$ Т-клетки способны стимулировать противоопухолевую активность NK-клеток. Изучение механизмов такой стимуляции привело к выявлению CD137 как одного из костимулирующих рецепторов NK-клеток. Авторы выяснили также, что активность  $\gamma\delta$ Т-клеток в качестве активатора NK-клеток усиливается в присутствии зометы - широко используемого в клинике индуктора  $\gamma\delta$ Т-клеток. Активированные зометой  $\gamma\delta$ Т-клетки существенно усиливали антителозависимую цитотоксичность NK-клеток против опухолевых клеточных линий в присутствии ритуксимаба (анти-CD20) и цетуксимаба (анти-Her2).

Основные результаты представленных в диссертации исследований А.В.Шаповала опубликованы в ведущих международных журналах, включая Nature Immunology, Blood, Clinical Cancer Research и Journal of Immunology. Их практическая значимость очевидна в связи с проходящими в настоящее время клиническими испытаниями антител против В7-НЗ в виде моно- или комбинированной терапии рака различных локализаций.

**Замечания.** Несмотря на общее очень благоприятное впечатление от диссертационной работы А.И. Шаповала, в порядке дискуссии хотелось бы высказать несколько замечаний. Вывод о том, что для активации НК-клеток необходимо два сигнала, выглядит упрощением. НК- клетки являются чрезвычайно гетерогенной популяцией, способной экспрессировать широкий спектр как активирующих, так и ингибирующих рецепторов. Аналогия с Т-клетками в данном случае не вполне справедлива. Автором не показано, что без дополнительных костимулирующих сигналов антителозависимая активация НК-клеток приводит к их анергии. В экспериментах по костимуляции НК-клеток  $\gamma\delta$ Т-клетками эффект от последних существенно превосходил эффекта анти-CD137 антител или CD137L-трансфицированных клеток. Эти результаты говорят о наличии дополнительных факторов стимуляции помимо CD137. Термин “натуральный иммунный ответ” неудачен. Есть общепринятое понятие “врожденный иммунный ответ”. Содержание некоторых статей (из списка опубликованных по теме диссертации) плохо отражено в тексте диссертации и реферате.

**Заключение.** В целом, можно заключить что диссертация А.И.Шаповала “НОВЫЕ КОСТИМУЛЯТОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ СЕМЕЙСТВА В7 И РОЛЬ КОСТИМУЛЯЦИИ В АКТИВАЦИИ НК-КЛЕТОК“, является научно-квалификационной работой, развивающей представления о роли костимулирующих рецепторов в регуляции иммунитета. Автором получены идентифицированы и детально изучены два ранее неизвестных члена В7-семейства костимулирующих рецепторов, а также представлены новые данные по регуляции функциональной активности естественных киллеров. Совокупность полученных результатов можно квалифицировать как новое научное достижение. Особенно важно, что на основе этих результатов уже созданы и проходят клинические

испытания новые средства противораковой терапии. По своей актуальности новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Шаповала Андрея Ивановича полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук (пункт. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями, содержащимися в Постановлении Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), а её автор, Шаповал А. И., заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальностям «03.01.03 – молекулярная биология» и «14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология».

Официальный оппонент Таранин Александр Владимирович

Зав. лабораторией иммуногенетики,

ИМКБ СО РАН, д.б.н.

taranin@mcb.nsc.ru

тел: 8(383)363 90 73

ФГБУН «Институт молекулярной и

клеточной биологии СО РАН», Лаврентьева 8/2

Новосибирск 630090,

тел: 8(383)363 90 41

Подпись Таранина А.В. заверяю:

Ученый секретарь ИМКБ СО РАН, к.б.н.

31.05.2019



Л.Г. Ахмерова