

ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Богомяковой Маргариты Евгеньевны
на тему: «Иммуногенность дифференцированных производных
плюрипотентных стволовых клеток человека»
по специальности 3.2.7. Иммунология

Открытие в 2006 г. возможности репрограммирования соматических клеток в плюрипотентное состояние, позволяющего получать индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), распахнуло двери в новый мир ранее невиданных перспектив в клеточной биологии, главная из которых – создание моделей заболеваний человека в чашке Петри – уже отмечена Нобелевской премией 2012 г. Не менее значимый потенциал, заложенный в иПСК, лежит в плоскости регенеративной медицины и касается применения дифференцированных производных иПСК в ткане-заместительной терапии. Отчасти этот потенциал иПСК уже реализуется в виде нескольких клинических испытаний иПСК, однако, для его полного раскрытия предстоит преодолеть ряд серьезных проблем. Часть этих проблем, как, например, тератогенность, является неотъемлемым свойством плюрипотентности и также касается эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), тогда как другая их часть, например, появление точечных мутаций, является следствием самого процесса репрограммирования.

Одна из критических проблем высветилась достаточно неожиданно в ходе трансплантаций у мышей, когда была показана иммуногенность аутологичных иПСК (но не ЭСК). Такой результат до известной степени подрывает *raison d'être* иПСК как источника дифференцированных клеток для аутологических трансплантаций, выигрывающего в этом отношении у заведомо аллогенных ЭСК. Нужно отметить, что указанная проблема была обойдена в текущих клинических испытаниях, где отработывалась трансплантация в иммуно-привилегированные органы, однако, она неизбежно возникнет в ходе трансплантаций в органы и ткани, лишенные

такого статуса. С другой стороны, высокая стоимость, длительность получения и верификации новых линий иПСК *clinical grade* на сегодняшний день не позволяют рассматривать трансплантацию аутологичных иПСК перспективной для широкой медицинской практики, а это выдвигает на передний план ЭСК и аллогенные иПСК, причем в условиях законодательства РФ – только последние. Поэтому актуальность рассматриваемой диссертационной работы, нацеленной на понимание молекулярной природы иммуногенности иПСК, равно как на разработку подходов для ее преодоления, трудно переоценить.

В диссертационной работе Богомяковой М.Е. поставлена цель оценить иммуногенность дифференцированных производных иПСК человека (в качестве таковых были выбраны фибробласты) в *in vitro* моделях аутологичных и аллогенных трансплантаций, опосредованную двумя ветвями иммунной системы – адаптивной (представленной CD8⁺ Т-лимфоцитам) и врожденной (представленной НК-клетками). Для достижения этой цели были поставлены и решены несколько задач, в ходе решения которых был получен ряд важных научных результатов, среди которых хочу отметить нежеследующие. Во-первых, впервые показано, что иммуногенность фибробластов-производных иПСК (клетки iPS-fibro), как аутологичных, так и аллогенных, опосредована иммунореактивностью НК-клеток, причем независимо от экспрессии HLA I класса (клетки ΔB2M-iPS-fibro). Это самый важный фундаментальный результат работы, который закладывает крепкую основу как для дальнейших исследований в этом русле. В отношении аллогенных iPS-fibro, что ожидаемо, дополнительно наблюдалась иммунореактивность Т-клеток, однако, в отношении аутологичных фибробластов – нет, что опровергает предшествующие результаты Zhao и др. (2011), полученные на мышинной модели. Далее, в контексте исследования причин повышения иммунореактивности к НК-клеткам в ходе репрограммирования, диссертант показал разбалансировку в iPS-fibro экспрессии лигандов к рецепторам НК-клеток, а именно, понижение

экспрессии лигандов к ингибирующим (HLA-I, B2M) и повышение экспрессии лигандов к активирующим рецепторам (MICA, NECTIN2 и др.). Дальнейшие усилия диссертанта были направлены на исследование возможности устранения этого дисбаланса. Было показано, что «дозревание» iPS-fibro посредством продолжительного пассирования приводит к увеличению экспрессии ингибирующих лигандов (HLA-I) без очевидного изменения экспрессии ингибирующих лигандов, однако, это не отражается на цитотоксической активности НК-клеток. В то же время диссертант показал возможность существенного снижения этой активности с помощью IFN γ – провоспалительного цитокина, известного, в том числе, своей способностью стимулировать HLA-I. Действительно, предварительная обработка iPS-fibro IFN γ приводило к более мощной (по сравнению с пассированием) стимуляции экспрессии HLA-I при заметно меньшей стимуляции ингибирующих лигандов. Указанные эффекты не наблюдались в контрольных клетках Δ B2M-iPS-fibro, что подтверждает роль HLA-I в модуляции иммунореактивности этих клеток к НК-клеткам как в аутологичных, так и в аллогенных моделях. Все полученные диссертантом результаты обладают высокой степенью новизны, вносят существенных вклад в понимание природы иммуногенности iPСК и подходов к ее преодолению.

Несмотря на то, что диссертационная работа носит характер фундаментального исследования, лежащего на стыке биологии плюрипотентных стволовых клеток и иммунологии, в ней четко прослеживается практический вектор. Действительно, понимание природы иммуногенности iPСК и разработка подходов к ее преодолению существенно приблизит нас к безопасной и эффективной реализации уникального потенциала iPСК в регенеративной медицине.

Достоверность полученных в диссертационной результатов не вызывает никаких сомнений. Выводы и научные положения

диссертационной работы надёжно обоснованы и вытекают из конкретных экспериментов, а также соответствуют поставленным целям и задачам. Также следует отметить высокий методический уровень исследования, использование современных подходов. Диссертационная работа и автореферат имеют хорошо воспринимаемую последовательную структуру, написана хорошим научным стилем, адекватно проиллюстрированы.

Результаты работы Богомяковой М.Е. опубликованы в 4 статьях, включая статью в *Stem Cell Res & Ther*, где она первый автор, докладывались на престижных международных мероприятиях.

В то же время, необходимо отметить некоторые недостатки работы. В первую очередь надо отметить нехватку дискуссионной составляющей, в которой бы полученные диссертантом результаты сопоставлялись с существующими на сегодняшний день данными и представлениями (которые прекрасно освещены во Введении). Так, например, никак не обсуждается отсутствие иммунореактивности iPS-fibro к аутологичным Т-клеткам – результат, опровергающий выводы Zhao и др. (2011). Также, диссертант никак не обсуждает возможность IFN γ -опосредованного снижения иммунореактивности iPS-fibro в разрезе практической реализуемости. Полученный результат, как мне кажется, носит характер *proof-of-principle*, является обоснованием стратегии, нацеленной на устранение разбалансировки экспрессии лигандов рецепторов НК-клеток, но никак не практический характер. Действительно, стимуляция HLA-I посредством IFN γ или какой-либо другой молекулы, помимо эффектов, которые еще предстоит оценить, приведет, по всей видимости, к усиленному Т-клеточному ответу в ситуации аллогенной трансплантации производных iPSC (а именно о такой в текущих реалиях следует говорить). Кроме того, каков будет долговременный эффект от повышения HLA-I в условиях реальной трансплантации? Хотелось бы увидеть более развернутую интерпретацию полученных результатов через призму современных сведений.

Есть менее серьезные замечания и рекомендации. Для полноты картины было бы правильно привести во Введении подход, основанный на индукции толерантности у реципиента к аллогенному донорскому материалу, в том числе к производным иПСК, с помощью DCreg-клеток. Далее привожу некоторые, бросившиеся в глаза опечатки: подпись к Рис. 7 (в автореферате) – «Б» вместо «В»; Стр. 9 (автореферат) и Рис. 14 (диссертация) – «ОСТ3/4» вместо «ОСТ $\frac{3}{4}$ »; Стр. 8 (автореферат) и Рис. 12 (диссертация) – «гидовой» вместо «гайдовой»; Стр. 6 (автореферат) – «существенную активацию» вместо «существенной активации»; Стр. 15 (автореферат) – следовало указать какие лиганды на Рис. 8Б соответствуют упомянутым в тексте НК-рецепторам (автореферат).

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 3.2.7. Иммунология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Богомякова Маргарита Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН
директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института цитологии Российской академии наук

ТОМИЛИН Алексей Николаевич

Контактные данные:

тел.: _____, e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.00.25 Гистология, цитология, клеточная биология

Адрес места работы:

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт цитологии Российской академии наук

Тел.: +7 (812) 297–18-29; e-mail: cellbio@incras.ru

Подпись сотрудника Института цитологии РАН

А.Н. Томилина удостоверяю: