

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Чепелевой Елены Васильевны «Характеристика регенеративного потенциала кардиальных стромальных клеток и кардиальных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 - клеточная биология.

Актуальность темы диссертационной работы

Среди причин роста заболеваемости и смертности населения в индустриальных странах, сердечно-сосудистые заболевания сохраняют своё печальное доминирование. Это обстоятельство определяет необходимость совершенствования способов лечения и реабилитации таких больных. Наибольшее значение среди данной группы патологий имеет ишемическая болезнь сердца (ИБС). Широкое внедрение в клиническую практику инвазивных технологий, направленных на реваскуляризацию миокарда, способствовало значительному успеху в предупреждении развития инфаркта миокарда и смертности от этого грозного осложнения ИБС. Достигнутые успехи обострили актуальность совершенствования подходов для коррекции постинфарктного ремоделирования сердечной мышцы и предупреждения развития хронической сердечной недостаточности ишемического генеза.

Рубеж XX-XXI веков ознаменовался активизацией работ в области клеточных технологий и попыткой быстрого их внедрения в практическую кардиологию с целью стимуляции регенеративного потенциала сердечной мышцы. Публикациями о работе в этом направлении отметились практически все ведущие центры страны, занимающиеся патологией сердца. Трансплантацию клеток использовали как при лечении острого инфаркта миокарда, так и для терапии сердечной недостаточности на фоне ишемической болезни. Показательной, отражающей общий настрой того времени, можно считать статью Юрия Никитича Беленкова «Пути развития отечественной кардиологии: итоги, планы, надежды» опубликованной в 2002г. в журнале

Кардиология. В статье отмечается, что в последнее время активно развивается клеточная терапия больных с постинфарктным кардиосклерозом. При этом клеточный материал вводится пациентам прямо в центр рубца, где введённые клетки превращаются в кардиомиоциты и начинают сокращаться.

Последующие исследования показали, что всё не так просто, и развитие регенеративной медицины требует развёрнутых фундаментальных исследований. В настоящее время определился целый ряд направлений в развитии клеточных технологий, с достаточно высокой вероятностью, позволяющий надеяться на реальное повышение регенеративных возможностей миокарда. К этим направлениям можно отнести исследование регенеративного потенциала региональных прогениторных клеток миокарда, клеток с индуцированной плюрипотентностью, а также создание объемных тканеинженерных конструкций на основе этих клеток.

Учитывая социальную значимость предупреждения развития сердечной недостаточности ишемического генеза, исследование, предпринятое Еленой Васильевной, несомненно, актуально и своевременно.

Научная новизна исследования

Научная новизна работы определяется тем, что, в условиях эксперимента, исследован регенеративный потенциал региональных прогениторных клеток миокарда при ишемическом поражении сердечной мышцы. В условиях *in vitro* показано, что регенеративный эффект клеточного материала, полученного из фрагментов предсердия, реализуется благодаря способности синтезировать ангиогенные ростовые факторы и формировать капилляроподобные структуры. Установлено, что усилению ангиогенного потенциала способствует использование клеточного материала из фрагментов предсердия в составе кардиосфер. Отмечено, что использование матрикса из фибринового геля при интрамиокардиальном введении клеточного материала позволяет снизить стресс трансплантации, это повышает переживаемость и функциональную состоятельность трансплантируемых клеток.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки человека линии iMA1L после дифференцировки в кардиальном направлении могут быть использованы для получения клеточных пластов кардиомиоцитов с устойчивой функциональной активностью.

Практическая ценность работы

Практическая значимость проведённого исследования представляется достаточно высокой. Показано, что использование региональных прогениторных клеток миокарда в составе кардиосфер является перспективным подходом для развития регенеративных технологий в кардиологии и, в частности, при коррекции постинфарктного ремоделирования сердечной мышцы. Результаты, полученные соискателем, могут быть использованы для разработки протоколов исследования эффективности клеточной терапии у пациентов с ИБС. Кроме того, полученные данные могут быть применены для создания перспективных тканеинженерных конструкций на основе кардиальных производных клеток с индуцированной плюрипотентностью.

Обоснованность и достоверность результатов и выводов диссертации

Достоверность результатов, приведенных в работе Е.В. Чепелевой, не вызывает сомнений. Все они получены с применением самых современных культуральных, молекулярно-генетических, функциональных, визуализирующих и гистологических методов исследования. В работе использована адекватная биологическая модель ишемического поражения сердечной мышцы. Обработка полученных данных проведена с применением корректных методов статистического анализа. Представленные в диссертации результаты достаточно полно опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК, и в материалах профильных конференций. Сделанные соискателем выводы обоснованы полученными результатами и соответствуют поставленным задачам.

Структура и общая характеристика диссертации

Диссертационная работа Елены Васильевны состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста, иллюстрирована 6 таблицами и 46 рисунками. Список литературы включает 278 источников (18 отечественных и 260 зарубежных публикаций).

В разделе «**Введение**» приведены основные положения, касающиеся актуальности тематики проведённого исследования, сформулированы цель и задачи, а также определены новизна, теоретическая и практическая значимость работы. В этом же разделе представлены положения, выносимые на защиту, и отражено личное участие автора в выполнении работы, заключающееся в изучении научной литературы, проведении молекулярно-генетических и культуральных исследований, анализе полученных результатов, подготовки к печати тезисов и статей по теме диссертации.

В первой главе представлен **обзор литературы**, в котором диссертант приводит детальную характеристику области своих исследований. Обзор содержит описание существующих представлений об этиологии и методах лечения ишемической болезни сердца. Автор подробно описывает результаты исследований, направленных на разработку подходов к реализации клеточной терапии ишемической болезни сердца. Приводит данные о регенеративном потенциале различных типов клеток и возможности их доставки в миокард. На основании анализа литературных данных диссертант заключает, что до сих пор не определен оптимальный тип клеток для трансплантации, недостаточно охарактеризованы свойства этих клеток и механизмы активации репаративных процессов в миокарде.

В главе «**Материалы и методы**» представлена информация об основных этапах работы, применяемых методах исследования, содержится перечень используемого оборудования и реактивов, указаны методы статистической обработки результатов. В работе применены традиционные

методы молекулярной генетики, такие как количественная ПЦР в режиме реального времени и ПЦР с обратной транскрипцией. Описаны протоколы получения и методы исследования культур клеток и кардиосфер из фрагментов предсердия человека и крыс, а также протокол получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека и формирования на их основе клеточных пластов кардиомиоцитов. Описаны биологические модели и методы инструментальных и лабораторных исследований, использованные для изучения регенеративного эффекта трансплантации клеточных материалов при ишемическом поражении миокарда. Используемые методы соответствуют современному уровню и описаны достаточно подробно.

Глава «**Результаты и обсуждение**» включает несколько подразделов, содержащих изложение фактических материалов исследования, которые представлены в таблицах и рисунках с подробным их описанием. Представлены данные, отражающие гетерогенность клеточных культур, получаемых из предсердий крыс и человека. Доказывается их способность (*in vitro*) к формированию капилляроподобных структур и экспрессии ангиогенных ростовых факторов. Приведены результаты, отражающие эффективность интрамиокардиальной инъекции клеточного материала при моделировании острого инфаркта миокарда и на фоне развившегося постинфарктного кардиосклероза у лабораторных животных. Установлено, что трансплантированные клетки уверенно визуализируются как минимум 10 дней после введения, а их протекторное действие обусловлено паракринным взаимодействием с миокардом.

Большим подразделом представлены результаты, отражающие возможность получения кардиомиоцитов из клеток человека с индуцированной плюрипотентностью и формирования на их основе клеточных пластов. Показано, что из клеток с индуцированной плюрипотентностью можно получить клетки, способные к реализации электро-механического сопряжения и по экспрессирующимся биомаркерам

относящиеся к вентрикулярным, атриальным и пейсмейкерным кардиомиоцитам. Функциональная активность таких клеток, сформированных в объемные конструкции, сохраняется и после трансплантации в организм лабораторного животного, при этом пребывание в условиях живого организма способствовало лучшей организации контрактильного аппарата этих клеток и установлению межклеточного взаимодействия через формирование десмосом. Отмечено, что такие объёмные конструкции могут быть дополнены клетками, стимулирующими процесс неоангиогенеза, что улучшит их приживаемость в патологически измененной сердечной мышце.

Результаты каждого из подразделов подробно проанализированы и сопоставлены с данными литературы. Выдвигаются предположения, объясняющие случаи расхождения собственных результатов с данными, представленными в работах других исследователей.

В «**Заключении**» Елена Васильевна подводит итог своего исследования, представляет обобщённый результат обсуждения полученных данных и отмечает их научно-практическую значимость для развития клеточных технологий в кардиологии.

Выводы соответствуют поставленным задачам и обоснованы результатами проведенных исследований.

Текст автореферата в полной мере отражает содержание работы и оформлен в соответствии с требованиями ГОСТ.

Замечания по диссертационной работе

При знакомстве с диссертацией обнаружен ряд некорректных оборотов и случаи неудачной компоновки материала:

1. В тексте диссертации говорится, что клеточные технологии перспективны при лечении ИБС. Мне представляется, корректнее говорить, что клеточные технологии позволят предупредить развитие хронической сердечной недостаточности ишемического генеза.

2. В главе «Результаты и обсуждение» есть случаи некорректного цитирования (ст. 106, 110 и др.).

3. В диссертации заявляется, что использованы аутологичные клеточные культуры и аутологичный фибриновый гель. Однако из «материалов и методов» следует, что клетки и гель получены из тканей других животных пусть и одной сублинии, а значит они аллогенны.

У меня не возникло принципиальных возражений по сути проведенного исследования, но есть ряд вопросов уточняющего характера:

1. На ст.112. отмечено, что «Через 5 недель после интрамиокардиальной трансплантации клеток животным проводили ЭКГ исследование, которое не выявило наличия эктопической электрической активности». Выявлялась ли эктопическая электрическая активность на других сроках наблюдения?

2. Почему спонтанные согласованные сокращения клеточного слоя наблюдались только у части образцов после инкубации под фиброзной капсулой почки?

3. Почему трансплантация под фиброзную капсулу почки позитивно влияла на структуру клеток, формирующих трансплантат?

4. С чем связано то, что кардиальные стромальные клетки после трансплантации в ишемизированный миокард крысы выживают до 8 и 14 дней, в составе суспензии и фибринового геля (соответственно), а кардиомиоциты, полученные из ИПСК, не менее 28 и 42 дней при трансплантации в виде пласта под кожу и фиброзную капсулу почки, соответственно?

Заключение

Диссертация Чепелевой Елены Васильевны «Характеристика регенеративного потенциала кардиальных стромальных клеток и кардиальных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека»,

представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельным завершенным научно-квалификационным исследованием. Считаю, что по своей актуальности, методам и объему выполненных исследований, научному содержанию, достоверности и значимости результатов, диссертационная работа Чепелевой Елены Васильевны соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 28.08.2017), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. - клеточная биология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, профессор,
заведующий лабораторией
молекулярно-клеточной патологии и
генодиагностики Научно-
исследовательского института
кардиологии Федерального
государственного бюджетного
научного учреждения
«Томский национальный
исследовательский медицинский
центр Российской академии наук»
(Томский НИМЦ)
Ул. Киевская, д. 111а, Томск, 634012,
тел./ факс (3822) 55-50-57/ 55-83-67,
www.cardio-tomsk.ru e-mail:
cardio@cardio-tomsk.ru



подпись

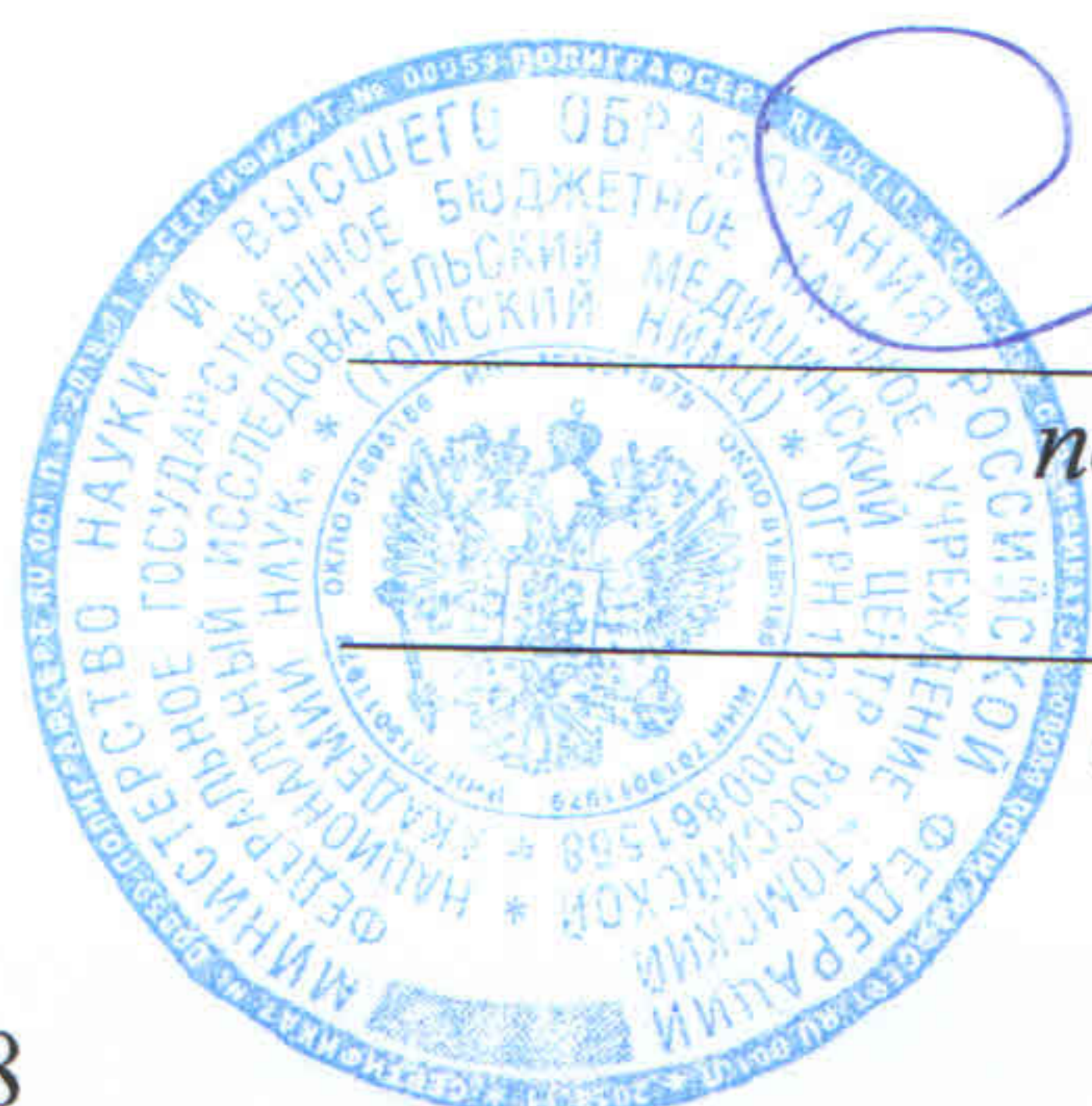
Афанасьев
Сергей Александрович

Подпись



заверяю.

Ученый секретарь Томского НИМЦ,
кандидат биологических наук
Ирина Юрьевна Хитринская



подпись

дата