

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.239.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 26 октября 2022 г. № 27

О присуждении Чепелевой Елене Васильевне, гражданке РФ,
учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Характеристика регенеративного потенциала кардиальных стромальных клеток и кардиальных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» по специальности 1.5.22. – клеточная биология, принята к защите 08.06.2022 г. (протокол заседания №10) диссертационным советом 24.1.239.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», (630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10). Диссертационный совет 24.1.239.01 (Д 003.011.01) утверждён ВАК 15.01.2010, приказ ВАК № 1-7 и переутверждён Министерством образования и науки РФ 11.04.2012 года, приказ № 105/нк.

Соискатель: Чепелева Елена Васильевна, 04 июня 1987 года рождения. В 2009 году окончила Новосибирский государственный университет по специальности «биология».

С 26.10.2009 г. по 11.02.2015 г. Чепелева Е.В. обучалась в очной аспирантуре Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск. С 2015 г. по настоящее время работает в лаборатории экспериментальной хирургии и

морфологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ в должности младшего научного сотрудника.

Диссертация выполнена в лаборатории эпигенетики развития Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Павлова Софья Викторовна** – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории эпигенетики развития ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Официальные оппоненты:

1. Амстиславская Тамара Геннадьевна – доктор биологических наук, заведующий лабораторией трансляционной биопсихиатрии отдела экспериментальной и клинической нейронауки Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины», г. Новосибирск.

2. Афанасьев Сергей Александрович – 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», г. Томск.

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург в своём положительном отзыве, подписанном директором

Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» д.м.н., Костаревой А.А. и руководителем группы молекулярных механизмов кальцификации Центра неизвестных, редких и генетически-обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» д.б.н., Малашичевой А.Б., утверждённом заместителем генерального директора по научной работе ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» д.м.н., профессором, академиком РАН, Конради А.О., указало, что «...диссертация Чепелевой Е.В. «Характеристика регенеративного потенциала кардиальных стромальных клеток и кардиальных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной научной задачи – поиска оптимального клеточного источника и совершенствование путей сохранения функциональной активности трансплантированных прогениторных клеток, имеющей значение для клеточной биологии и фундаментальной биомедицины. Работа соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в актуальной редакции)», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор Чепелева Елена Васильевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология. Отзыв на диссертацию Чепелевой Елены Васильевны обсуждён и одобрен на заседании Проблемной комиссии «Клеточная и молекулярная биология, генетика» Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол № 3 от 31 августа 2022 г.»

Соискатель имеет всего 41 опубликованную работу, в том числе по теме диссертации опубликовано 12 работ общим объемом 68 страниц, из них 8 статей в рецензируемых российских научных журналах, в том числе 5 статей в журналах, входящих в международные базы цитирования (WoS, Scopus), и 4

публикации в сборниках тезисов докладов российских научных конференций с международным участием. Во всех опубликованных работах личный вклад автора был определяющий. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах.

Наиболее значительные статьи по теме диссертации:

1. Павлова С.В., Перовский П.П., **Чепелева Е.В.**, Малахова А.А., Дементьева Е.В., Покушалов Е.А., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Характеристика кардиальных культур клеток, полученных из экспланта сердечной мышцы человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013. – №4. – С.132-141. doi:10.1007/s10517-013-2295-x. (Scopus).

2. **Чепелева Е.В.**, Павлова С.В., Малахова А.А., Милевская Е.А., Русакова Я.Л., Подхватилина Н.А., Сергеевичев Д.С., Покушалов Е.А., Караськов А.М., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Терапия хронического кардиосклероза у крыс линии WAG культурами кардиоваскулярных клеток, обогащенными стволовыми клетками сердца // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2015. – №3. – С.191-201. doi: 10.1007/s10517-015-3119-y. (Scopus).

3. Павлова С.В., Леонова Е.А., **Чепелева Е.В.**, Докучаева А.А., Сергеевичев Д.С., Покушалов Е.А. Мониторинг трансплантации кардиальных клеток в зону ишемического поражения миокарда с использованием люциферазной репортерной системы // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12. – №4. – С.69-75. doi: 10.23868/201707032. (Scopus).

4. Павлова С.В., **Чепелева Е.В.**, Дементьева Е.В., Григорьева Е.В., Сорокоумов Е.Д., Слотвицкий М.М., Пономаренко А.В., Малахова А.А., Докучаева А.А., Сергеевичев Д.С., Покушалов Е.А., Закиян С.М. Исследование выживаемости и функциональной активности кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК человека, при трансплантации в мышечной линии SCID // Гены и клетки. – 2018. – Т. 13. – №. 4. – С. 51-60. doi: 10.23868/201812047. (Scopus).

На диссертацию и автореферат поступило 8 отзывов, все положительные.

Отзывы прислали:

1. Лебедев И.Н. – д.б.н., профессор РАН, руководитель лаборатории онтогенетики НИИ медицинской генетики, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск.

2. Салмина А.Б. – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник и заведующий лабораторией нейробиологии и тканевой инженерии, заведующий отделом молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», г. Москва.

3. Дергилев К.В. – к.м.н., ведущий научный сотрудник Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦК имени ак. Е.И. Чазова» МЗ РФ, г. Москва. Замечание: «1) Исследование секреции проангиогенных факторов роста кардиальными стромальными клетками проводится только методом ПЦР в реальном времени и не подкреплено результатами Elisa и/или альтернативными тестами (например, Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit). 2) Не приведены данные по влиянию трансплантации кардиальных стромальных клеток в составе носителя (фибринового геля) (подхода, повышающего выживаемость клеточного препарата) на параметры постинфарктного ремоделирования и функциональные показатели работы сердца».

4. Повещенко А.Ф. – д.м.н., заведующий лабораторией физиологии протективной системы НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск.

5. Дашинимаев Э.Б. – к.б.н., старший научный сотрудник Центра высокоточного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГАОУ ВО РНИМУ ИМ. Н.И. Пирогова, г. Москва. Замечание: «1) Автор в нескольких местах указывает, что регенеративный эффект от введения кардиальных стромальных клеток достигается за счет паракринного эффекта, то есть секретлируемых цитокинов и факторов роста. Данное

утверждение следует подтверждать экспериментами с введением кондиционированной среды (и/или ее дериватами) с контролем в виде «пустой» среды, в такой же модели ишемии сердца. Однако таких данных в автореферате не представлено. 2) Отсутствует явно-различимый логический «мостик» между двумя блоками данных с кардиальными стромальными клетками и кардиомиоцитами из ИПСК. Напрашиваются эксперименты по сравнению результатов с применением обоих типов клеток, в одних и тех же моделях. В работе присутствуют намеки на то, что кардиомиоциты из ИПСК являются более приоритетным материалом для трансплантаций, которые, однако необходимо подтверждать экспериментами».

6. Серяпина А.А. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории эволюционной генетики ФИЦ ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск.

7. Жарков Д.О. – член-корреспондент РАН, д.б.н., заведующий лабораторией геномной и белковой инженерии ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск. Замечание: «1) Раздел «Материалы и методы» представляется излишним, поскольку в нем очень мало собственно экспериментальных деталей, и это место можно было бы более эффективно использовать для представления вводной информации о клеточной физиологии миокарда, важной для понимания работы. 2) Из рис. 2 и описывающего его текста непонятно, относительно чего измеряли экспрессию генов».

8. Салахов Р.Р. – к.м.н., научный сотрудник лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что официальные оппоненты являются компетентными специалистами в области биомедицинских исследований, имеют публикации в ведущих биологических журналах и дали своё письменное согласие быть оппонентами. Ведущая организация является одним из ведущих учреждений в области изучения молекулярно-генетических основ возникновения сердечно-

сосудистых заболеваний, заболеваний крови, эндокринных органов и ревматических болезней; разработки способов прогнозирования их развития у здоровых лиц; определения индивидуальных подходов к профилактике и лечению болезней сердца, сосудов, эндокринной патологии, крови, ревматических болезней на основе генетических карт больных; развития новых технологий клеточной терапии и внедрения нанотехнологий в лечение сердечно-сосудистых и других заболеваний.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований доказано, что культуры, полученные из ткани предсердий человека и животных методом формирования кардиосфер, содержат кардиальные стромальные клетки, которые обладают ангиогенным потенциалом и при интрамиокардиальной трансплантации экспериментальным животным с моделью хронического кардиосклероза приводят к уменьшению площади постинфарктного фиброза миокарда. **Доказано,** что клетки, полученные при дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в кардиальном направлении, представляют собой полиморфную популяцию кардиомиоцитов, которые сохраняют способность к спонтанному сокращению после введения в виде функциональных клеточных пластов под фиброзную капсулу почки иммунодефицитных мышей.

Теоретическая значимость работы обоснована тем, что изучены морфологические и функциональные особенности клеток, полученных из ткани предсердий человека и животных или из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, для разработки технологий клеточно-опосредованной терапии хронической сердечной недостаточности ишемического генеза.

Показано, что в культурах кардиальных стромальных клеток, полученных методом формирования кардиосфер из фрагментов предсердий человека и крысы, наблюдается экспрессия генов-маркеров мезенхимальных (*CD73*, *CD90*, *CD105*) и эндотелиальных клеток (*CD31*), ряда генов

характерных для перицитов (*aSMA*, *NG2*, *Nestin*, *PDGFRb*), а также гена рецептора эндотелиального фактора роста сосудов *VEGFR2*.

Показано, что кардиальные стромальные клетки в системе *in vitro* способны к формированию капилляроподобных структур, а *in vivo*, после трансплантации в виде суспензии в периинфарктную зону миокарда крыс, уменьшают объем рубцовой ткани, но имеют сниженную жизнеспособность и не способствуют восстановлению сократительной функции сердца.

Показано, что кардиальные производные индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, трансплантированные под капсулу почки иммунодефицитных мышей в виде клеточных пластов, сохраняют функциональную активность и обладают более выраженными, по сравнению с условиями *in vitro*, способностями к формированию упорядоченного сократительного аппарата клетки.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработаны протоколы получения, предтрансплантационной подготовки и последующей трансплантации клеток двух типов: кардиальных стромальных клеток, полученных из предсердий человека и крысы, и кардиальных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, а также **предложен методический подход** для интрамиокардиальной трансплантации клеточного материала с применением фибринового геля, полученного из плазмы венозной крови, который может быть использован в дальнейшем для повышения эффективности клеточной терапии при ишемическом поражении миокарда.

В ходе выполнения работы **получены** новые данные о возможности модификации ангиогенного потенциала стромальных клеток сердца и лучшей выживаемости этих клеток при их использовании в формате клеточных пластов, что может быть использовано при создании препаратов с использованием генов, вовлеченных в ангиогенез, и при разработке новых подходов в регенеративной медицине.

Результаты диссертационной работы представляют интерес для научно-исследовательских и медицинских учреждений, связанных с фундаментальными и прикладными исследованиями в области регенеративной медицины, а также в образовательном процессе при подготовке специалистов в области молекулярной и клеточной биологии, физиологии и медицины.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован широкий спектр методов клеточной биологии и молекулярной генетики, включая получение первичных клеточных культур из предсердий человека и животных и их пассирование, направленную дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в кардиомиоцитарном направлении, иммуногистохимический анализ с применением флюоресцентной и конфокальной микроскопии, проточную цитофлюориметрию, полимеразную цепную реакцию с детекцией результата по конечной точке и в режиме реального времени, экспериментальное моделирование инфаркта миокарда на животных, гистологическое окрашивание и морфометрический анализ, люминесцентный метод анализа, а также методы статистического анализа данных, которые позволили исследовать морфофункциональные особенности кардиальных стромальных клеток и кардиальных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека с целью их возможного использования в терапии заболеваний сердца ишемического генеза.

Оценка достоверности результатов исследования выявила их высокую надежность, которая подтверждается экспериментальными данными, полученными с использованием современных методов, адекватных поставленным задачам, позволивших провести комплексное изучение морфологических и функциональных особенностей клеток, полученных из ткани человека и животных или из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, а также оценить динамику

сохранения функциональной активности этих клеток после трансплантации в живой организм. Эксперименты проведены на достаточном количестве животных и выполнены с соблюдением всех необходимых этических требований. Поставленные в исследовании задачи успешно решены благодаря оптимальному дизайну работ с клеточными культурами и экспериментальными животными. Научные положения, выносимые на защиту, в полной мере подтверждены результатами исследований, продемонстрированными в виде рисунков и таблиц.

Результаты исследования статистически обработаны, достоверны и могут быть использованы другими исследователями. При обсуждении результатов работы, касающихся оценки выживаемости кардиальных стромальных клеток, трансплантированных в перинфарктную зону миокарда крыс, учитывались данные, полученные ранее другими исследователями по рассматриваемой тематике.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии в планировании и проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации экспериментальных данных, участии в апробации результатов исследования и подготовке публикаций. Основные результаты исследования получены автором самостоятельно.

Эксперименты по моделированию инфаркта миокарда проводились совместно с Я.Л. Русаковой (ФГБУ НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина МЗ РФ, г. Новосибирск), анализ клеточных пластов кардиомиоцитов с помощью электронной микроскопии – совместно с д.б.н. Бгатовой Н.П (НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск), электрофизиологическая характеристика клеток методом локальной фиксации потенциала проводилась Е.Д. Сорокоумовым (ФИЦ ИВТ СО РАН, г Новосибирск), ультразвуковое исследование сердца у крыс – Ю.Б. Шехтман (КДЦ «Евровет», г. Новосибирск).

Полученные соискателем научные результаты соответствуют специальности 1.5.22. – клеточная биология (биологические науки).

В ходе защиты диссертации критических замечаний высказано не было. Соискатель Чепелева Е.В. аргументировано ответила на все задаваемые ей в ходе заседания вопросы.

Диссертационным советом сделан вывод о том, что диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную работу, соответствует критериям пп 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

Диссертационный совет 26 октября 2022 г. принял решение присудить Чепелевой Е. В. ученую степень кандидата биологических наук за решение научной задачи, связанной с анализом морфологических и функциональных особенностей кардиальных стромальных клеток, полученных из ткани человека и животных, и кардиальных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, а также с разработкой методических подходов для сохранения их функциональной активности после трансплантации в живой организм.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 7 докторов наук по специальности, участвующих в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 20, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель

диссертационного совета

академик РАН

Учёный секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук



В.К. Шумный

Т.М. Хлебодарова

26.10.2022 г.