

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА
Д 001.004.01 НА БАЗЕ ФГБНУ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ МОРФОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от «17» декабря 2020 г. № 25
о присуждении Салиховой Диане Ирековне, гражданке Российской
Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Нейропротективные свойства нейрональных и глиальных клеток-предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология принята к защите 8 октября 2020 года (протокол № 21) диссертационным советом Д 001.004.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» (117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3), сайт организации www.morfolhum.ru, созданном в соответствии с приказом Минобрнауки России № 105/нк от 11 апреля 2012 г.

Соискатель Салихова Диана Ирековна, 1990 года рождения, в 2017 году окончила магистратуру Российского Химико-Технологического Университета имени Д. И. Менделеева по специальности: «биотехнологии». С 2017 года и по настоящее время работает научным сотрудником в ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» в лаборатории генетики стволовых клеток. В 2019 г. прикреплена к ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» для работы над кандидатской диссертацией по теме: «Нейропротективные свойства нейрональных и глиальных клеток-предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека». Диссертация выполнена на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова».

Научные руководители: 1. **Гольдштейн Дмитрий Вадимович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики стволовых клеток ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»; 2. **Фатхудинов Тимур Хайсамудинович**, доктор медицинских наук, доцент, заместитель директора по научному развитию ФГБНУ «НИИ морфологии человека».

Официальные оппоненты: 1. **Панова Александра Витальевна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2. **Силачев Денис Николаевич**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории структуры и функции митохондрий Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук». В положительном отзыве, подписанном Закияном Суреном Минасовичем, доктором биологических наук, профессором, заведующим лабораторией эпигенетики развития, указано, что диссертация Салиховой Д.И. соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук, автор достоин присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

По теме диссертации соискатель имеет 16 работ, из них 5 статей в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в

которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук, 9 публикаций в материалах конференций и 2 патента на изобретения. Все 16 работ Салиховой Д.И. написаны в соавторстве, в 8 из них соискатель является первым автором. Общий объем публикаций составляет 76 страниц.

Наиболее значимые работы:

1. Салихова Д.И., Федюнина И.А., Бухарова Т.Б., Гольдштейн Д.В., Киселев С.Л. Ключевые этапы дифференцировки ИПСК в нейрональные и глиальные клетки //Гены и клетки. – 2018. – Т.13. – №3. – С.52-55..

2. Салихова Д.И., Леонов Г.Е., Бухарова Т.Б., Корниенко З.В., Булатенко Н.В., Ефремова А.С., Махнач О.В., Макаров А.В., Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х., Гольдштейн Д.В. Сравнительный анализ влияния кондиционированных сред, полученных от нейрональных и глиальных предшественников, на мозжечковые нейроны при глутаматной эксайтотоксичности //Гены и Клетки. – 2019. – Т.14. – №4. – С. 46-53.

3. Салихова Д.И., Леонов Г.Е., Бухарова Т.Б., Булатенко Н.В., Ефремова А.С., Махнач О.В., Макаров А.В., Фатхудинов Т.Х., Гольдштейн Д.В. Сравнительный анализ паракринного действия нейрональных и глиальных предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека //Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2020. – №1. – С.62-68.

Недостовверные сведения об опубликованных соискателем работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации, в диссертации отсутствуют.

На автореферат поступили отзывы: 1. От доктора биологических наук, профессора, ведущего научного сотрудника лаборатории ангиогенеза ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России **Ю.А. Романова**; 2. От кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории клеточной биологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр

физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства» **А.В. Еремеева.**

Отзывы положительные, критических замечаний в отзывах по представленной работе нет. Отзывы содержат информацию об актуальности настоящего исследования, новизне полученных результатов и значимости их для науки и практики. Отмечено, что диссертационная работа выполнена в полном объеме на высоком научном уровне, выводы диссертации достоверны и полностью соответствуют поставленным задачам.

Выбор ведущей организации обоснован тем, что Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» является одним из ведущих учреждений, специализирующихся в области клеточной биологии и цитологии, а в лаборатории эпигенетики развития в течение многих лет проводятся исследования по разработке новых подходов лечения различных заболеваний головного мозга с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. **Выбор официальных оппонентов обоснован** тем, что **Панова Александра Витальевна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации является одним из ведущих специалистов в области изучения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в том числе и их применения для терапии ряда заболеваний эндокринной системы. **Силачев Денис Николаевич**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории структуры и функции митохондрий Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова является

специалистом в области молекулярной биологии ишемических повреждений головного мозга.

Диссертационный совет отмечает, что на основании проведенных соискателем исследований **определена** роль нейрональных и глиальных клеток-предшественников в паракринной регуляции репаративных процессов нервной ткани. Обоснован новый подход бесклеточной терапии сосудистых заболеваний головного мозга, базирующийся на использовании данных о составе и свойствах кондиционированной среды глиальных клеток-предшественников. Показана безопасность и эффективность данного подхода в моделях глутаматной эксайтотоксичности и гипоксии *in vitro* и ишемического инсульта *in vivo*. **Установлены** ключевые факторы, секретируемые нейрональными и глиальными клетками-предшественниками и стимулирующие регенерацию нервной ткани. При сравнительном протеомном анализе секретома двух культур **обнаружено**, что 45% нейронального и 31% глиального секретома составляют уникальные белки. При этом в секретоме глиальных клеток-предшественников больше концентрация нейротрофического фактора мозга (BDNF), цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), фактора роста нервов (NGF) и глиального нейротрофического фактора (GDNF). На моделях глутаматной эксайтотоксичности, гипоксии и ишемического инсульта показано, что более высоким нейропротективным потенциалом обладает кондиционированная среда глиальных клеток-предшественников. Механизмы действия связаны с нейропротективным эффектом, обусловленным уменьшением неврологического дефицита животных с ишемическим инсультом, прорегенеративным эффектом, приводящим к увеличению количества новообразованных кровеносных сосудов в области ишемического повреждения головного мозга крыс, и противовоспалительным эффектом, основаны на снижении инфильтрации фагоцитирующих CD68⁺-макрофагов, повышении экспрессии генов противовоспалительных цитокинов – интерлейкинов 4, 10, 13 и уменьшении провоспалительного цитокина –

фактора некроза опухоли, что было **подтверждено** гистологическим, иммуногистохимическим, биохимическими и молекулярно-генетическими методами исследования.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что доказаны следующие положения: дана сравнительная оценка эффективности полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека нейрональных и глиальных клеток-предшественников в паракринной регуляции репаративных процессов нервной ткани. Установлено, что кондиционированная среда глиальных клеток-предшественников при ишемическом повреждении головного мозга, в большей степени, чем нейрональных, обладает нейропротективными, противовоспалительными и прорегенеративными свойствами.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопии, компьютерная морфометрия гистологических препаратов, иммуногистохимический и иммуноцитохимический анализы, иммуноферментный анализ, методы оценки цитотоксичности (МТТ и ЛДГ-тесты), ПЦР в режиме реального времени, протеомные исследования, поведенческие тесты и статистический анализ данных.

Изложены достоверные доказательства того, что при ишемическом и эксайтотоксичном повреждении головного мозга наибольшей терапевтической эффективностью обладает кондиционированная среда, полученная при культивировании глиальных клеток-предшественников.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что полученные данные являются экспериментальным обоснованием использования кондиционированной среды, полученной из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, дифференцированных в глиальном направлении, для терапии ишемического инсульта. Выделение из кондиционированной среды

глиальных клеток-предшественников видоспецифических белков и полипептидов послужит основой для создания персонализированных ноотропных лекарственных препаратов нового поколения.

Результаты настоящего исследования используются в лекционных курсах для аспирантов и ординаторов в ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова».

Оценка достоверности результатов исследования выявила: достоверность результатов диссертационной работы обоснована достаточным количеством наблюдений, экспериментальных групп и воспроизводимостью результатов. Результаты проведенных исследований были получены с использованием современных молекулярно-генетических, гистологических, иммуноцитохимических, биохимических методов и на сертифицированном оборудовании: люминесцентный инвертированный микроскоп Axio Observer.D1 (Carl Zeiss, Германия), термоциклер BioRad iQ cycler (BioRad, США), планшетный ридер (PerkinElmer, США), высокоэффективный жидкостной хроматограф (ВЭЖХ) соединенный с масс-спектрометром Q-exactive HF (Thermo Scientific, США), проточный цитофлуориметр CyFlow ML (Partec, Германия), магнитно-резонансный томограф для мелких животных 7T ClinScan (Bruker BioSpin, США).

Теория исследования построена на известных данных о том, что терапевтическая эффективность клеточной терапии обусловлена не только способностью клеток интегрироваться в ткань реципиента и замещать погибшие клетки, но и оказывать локальное действие, влияя на регенеративные процессы. **Идея базируется** на анализе данных других авторов о том, что терапия на основе кондиционированных сред представляет альтернативу молекулам с одной мишенью, так как первая обеспечит высокую эффективность терапии ишемических заболеваний. Ранее в ряде работ, выполненных на различных моделях повреждения головного мозга и нейродегенеративных заболеваний, было показано нейропротективное, нейротрофическое и противовоспалительное действие

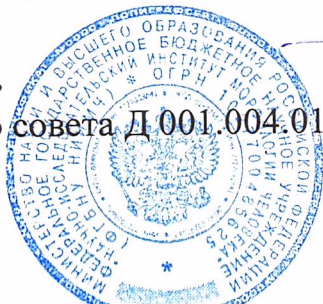
кондиционированных сред мезенхимальных стромальных клеток, в то время как полностью отсутствует информация о влиянии секретируемых веществ нейрональными и глиальными клетками-предшественниками, полученными из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, на регенерацию нервной ткани. **Использовано** сравнение собственных результатов и данных, полученных ранее другими исследователями по тематике, посвященной изучению свойств кондиционированных сред. Полученные результаты частично согласуются с ранее опубликованными исследованиями, демонстрирующими эффективность кондиционированных сред в моделях *in vitro* и *in vivo*, так как во многих работах было показано уменьшение объема ишемического повреждения головного мозга при введении животным секрета мезенхимальных стромальных клеток.

Личный вклад соискателя состоит в: анализе литературы и определении научной проблемы, планировании и проведении экспериментов, выборе методов исследования, подборе адекватных моделей, заборе материала для исследования, анализе экспериментальных данных и их статистической обработке, обобщении результатов исследования и подготовке публикаций.

На заседании 17 декабря 2020 г. диссертационный совет принял решение присудить Салиховой Диане Ирековне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 5 докторов наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология, из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали: за – 14, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета Д 001.004.01
профессор д.м.н.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 001.004.01, д.б.н.



Л.М. Михалева

А.М. Косырева
«18» декабря 2020 г.