

Генеральный директор Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр Физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» член-корр.

РАН, профессор Вадим Маркович Говорун

В.М. Говорун

15.04.2016



Отзыв ведущей организации

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» на диссертационную работу Андреевой Натальи Вячеславовны «Долговременное культивирование мезенхимальных стволовых клеток мышцы для тканевой инженерии», предоставленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Актуальность темы исследования.

Актуальность работы по подбору условий долговременного культивирования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) связана с сохранением клеточного потенциала и жизнеспособности стволовых клеток при долговременном культивировании для целей клеточной терапии и тканевой инженерии. В качестве подложки для культивирования клеток был использован полимерный пористый матрикс из поли-3-оксибутирата, полученный микробиологическим способом.

При использовании стволовых клеток в медицине и биотехнологии возникает ряд проблем, связанных с позиционированием стволовых клеток в органах и сложность их наработки в больших количествах, так как через небольшое время культивирования клетки начинают стареть, в них накапливаются мутации, что препятствует их использованию в качестве терапевтического средства. Поэтому, достижение долговременного культивирования стволовых клеток и наработка их клеточной массы является актуальной задачей в биотехнологии.

Автором проанализированы источники литературы, описывающие различные условия культивирования клеток, применение подложек из разных материалов для ведения клеточных культур в тканевой инженерии.

Проведенные в диссертационной работе исследования, сделанные обобщения и выводы являются значимым практическим приложением к решению задач по долговременному культивированию клеток.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций диссертации определяется значительным объемом экспериментальных данных, включающих как результаты анализа используемых полимерных матриц, так и результаты комплексного исследования МСК при их культивировании в различных режимах. В ходе работы над диссертацией, автором применены адекватные поставленным задачам методы исследования и статическая обработка полученных данных.

Научная новизна исследований и значимость полученных результатов.

В диссертационной работе впервые было показано долговременное культивирование стволовых клеток мыши на пористом матриксе из поли-3-оксибутирата, увеличение скорости пролиферации клеток, снижение скорости старения клеток, по сравнению с контролем, где клетки культивировались на культуральном пластике. Были разработаны способы получения полимера поли-3-оксибутирата микробиологическим способом и изготовления пористого матрикса на основе этого полимера, так же были подобраны оптимальные условия культивирования стволовых клеток в объеме матрикса. Были исследованы физико-химические свойства матрикса и его биосовместимость *in vitro*, скорость пролиферации стволовых клеток и продолжительность роста клеток, и их жизнеспособности при долговременном культивировании на матриксе (на модели мышинных стволовых клеток), старение стволовых клеток, культивируемых на пористом матриксе, изменение размеров столбовых клеток в зависимости от способа культивирования.

Практическая значимость работы заключается в разработке новых методов долговременного культивирования стволовых клеток на полимерном пористом матриксе, решения проблемы наработки клеток в большом количестве для дальнейших терапевтических и научно-исследовательских целей.

Разработаны оптимальные условия для длительного культивирования и поддержания жизнеспособности клеток, а также наращивания клеточной массы. В перспективе разработанная методика может быть применена для наработки МСК мышцы (широко используемого лабораторного животного в биомедицине) в биореакторах для научно-исследовательских целей и биофармацевтики, а научные основы метода – для наработки МСК человека с целью их клинического использования. Таким образом, полученные данные показывают, что трехмерный матрикс на основе ПГБ, является подходящим субстратом для длительного культивирования МСК для их возможного дальнейшего применения в терапевтических целях в регенеративной медицине, а также в научно-исследовательских целях и биотехнологии.

Полнота изложения основных результатов диссертации в рецензируемых научных изданиях и их апробация.

Основные результаты диссертации опубликованы в 7 печатных работах в рецензируемых российских научных журналах, рекомендованных ВАК, и 1 статья в зарубежном рецензируемом журнале.

Оценка содержания и оформления работы.

Диссертация построена по традиционному плану и включает в себя введение, основную часть (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты экспериментов и их обсуждения), заключение, выводы и список литературы.

Во введении автором обоснована актуальность и необходимость проведения исследований по длительному культивированию стволовых клеток, создание подходящих матриц для культивирования. Сформулированы цели и задачи исследования, определена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту, обоснована степень достоверности и апробация результатов исследования, представлены объем и структура диссертации.

Обзор литературы посвящен анализу проблемных вопросов по культивированию клеток и по биосовместимости разнообразных материалов. Рассматриваются особенности биосовместимости материалов с клетками и тканями, их основные биологические, физико-химические и механические свойства. Были описаны основные свойства поли-3-оксибутирата, биосинтез и внутриклеточная деградация. Уделено внимание проблеме культивирования стволовых клеток, репликативному старению клеток в культуре, проблемам и перспективам применения стволовых клеток в медицине.

В «Материалах и методах» приведены описание экспериментального материала и использованных методов исследования, которые позволили автору полностью реализовать поставленную цель и задачи.

В «Результатах исследования и их обсуждении» представлены экспериментальные данные по исследованию поли-3-оксибутирата и долговременному культивированию стволовых клеток мыши в объеме. Проведена статическая обработка полученных результатов. Проведен анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы.

В заключении обобщается то, что проведенные исследования позволили автору выявить ряд закономерностей по долговременному культивированию клеток, по сохранению жизнеспособности, снижению старения и сохранению клеточного потенциала при долговременном культивировании.

Выводы обоснованы результатами исследования и отражают основные положения, выносимые автором на защиту.

Содержание автореферата соответствует основным положениям, изложенным в диссертации.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Полученные автором результаты статут значимым практическим приложением к решению проблем по сохранению клеток их жизненного потенциала при долговременном культивировании. Данная работа может найти применение в тканевой инженерии, клеточной терапии и биотехнологии.

Недостатки диссертации.

В представленном тексте диссертации присутствуют опечатки и ошибки, например стр 49: «МСК используют в качестве таргетного средства **в доставки** терапевтических генов в опухоли различной этиологии.» или «В последние годы проведены эксперименты по влиянию МСК после введения крысам с черепно-мозговой травмой, **которые являются одной из актуальных проблем в неотложной нейрохирургии**» - не согласованность в фразе искажает ее смысл.

К замечанию по оформлению работы следует отнести то, что многие рисунки представлены в сыром виде, с условными обозначениями, без расшифровки, что существенно затрудняет восприятие результатов.

К принципиальным замечаниям к диссертационной работе стоит отнести следующее:

1. Сравнение свойств 3Д матрикса из поли-3-оксибутирата по отношению к культивированию клеток производилось с культуральным пластиком, который не

является 3Д структурой. Т е на свойства клеток может иметь влияние как структура, так и химический состав субстрата, а эти независимые параметры не были исследованы.

2. Было бы целесообразно изучить влияние параметров 3Д матрикса; размеры пор, хим состав на культивирование клеток.
3. Измеренное сокращение размеров клеток, при культивирование на 3Д матриксе по сравнению с культуральным пластиком не четко объяснено, нет сравнения с другими случаями 3Д культивирования.
4. Не обсуждается, как связано замедление старения клеток с изменением их размеров.

Однако эти замечания не снижают ценность полученных в диссертации данных и сделанных автором выводов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

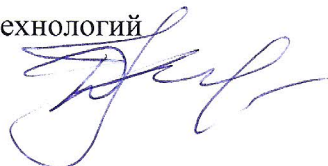
Диссертационная работа Андреевой Натальи Вячеславовны: «Долговременное культивирование мезенхимальных стволовых клеток мышцы для тканевой инженерии», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, представляет собой прикладное научное исследование на актуальную тему.

Новые научные результаты, полученные диссертантом имеют существенное значение как для прикладной науки, так и для практических приложений. Выводы и заключения достаточно обоснованы. Таким образом, работа отвечает всем требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Андреева Наталья Вячеславовна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности «Биотехнология (в том числе и бионанотехнологии)» 03.01.06

Отзыв на диссертацию и автореферат обсужден на семинаре отдела биофизики, 8
апреля 2016 г., протокол № 1 от 8.04.2016

Отзыв составил

Заведующий лаборатории Медицинских нанотехнологий
ФНКЦ ФХМ ФМБА, к.ф.-м.н



Д.В. Клинов

Dmitry.klinov@niifhm.ru

Тел. 84992464519

Подпись Д.В. Клинова

удостоверяю

Ученый секретарь ФНКЦ ФХМ ФМБА

к.б.н



Л.Л. Васильева

15.04.2016

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

по диссертационной работе **Андреевой Натальи Вячеславовны** «Долговременное культивирование мезенхимальных стволовых клеток для тканевой инженерии» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Полное название организации в соответствии с Уставом	Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр Физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства
Сокращенное наименование организации в соответствии с Уставом	ФНКЦ ФХМ
Почтовый адрес и адрес организации	119435, Россия, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а
Веб-сайт	http://test.ripcm.org.ru
Телефон\факс	+7 (499) 246-4409
Адрес электронной почты	info@niiifhm.ru
Список публикаций: 1. PanovaAV, NekrasovED, Lagarkova MA, KiselevSL, BogomazovaAN. Late replication of the inactive x chromosome is independent of the compactness of chromosome territory in human pluripotent stem cells. // ActaNaturae. 2013 Apr; 5(2):54-61. 2. Sharovskaya YY, Philonenko ES, Kiselev SL, Lagarkova MA. De novo reestablishment of gap junctional intercellular communications during reprogramming to pluripotency and differentiation. // StemCellsDev. 2012 Sep 20;21(14):2623-9. 3. Бродский И.Б., Брянцева С.А., Жаппарова О.Н., Ковалева А.М., Урюпова Е.Ф., Гусев С.А., Сергиенко В.И. Применение мезинхимальных стволовых клеток для восстановления структуры и функции поврежденных тканей и органов.Эфферентная и физико-химическая медицина (2011), №1: 4-10	

Ученый ФХМ,

к.б.н

15.04.2016



Л.Л. Васильева