

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Андреевой Натальи Вячеславовны на тему «Долговременное культивирование мезенхимальных стволовых клеток мышцы для тканевой инженерии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 — Биотехнология (в том числе Бионанотехнологии)

Знакомство с авторефератом Н.В. Андреевой на тему «Долговременное культивирование стволовых клеток мышцы для тканевой инженерии» позволяет судить о диссертационной работе как о значимом с практической точки зрения исследовании, актуальным по избранной теме.

Целью данной работы выступает изучение возможности длительного культивирования мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани мышцы на пористом матриксе на основе поли(3-гидроксibuтирата), подбор оптимальных условий роста клеток, а также увеличение клеточной массы и замедление клеточного старения клеток в процессе их культивирования.

Актуальность исследования продиктована, прежде всего тем, что поражения органов и тканей в результате хронических заболеваний, травм и врожденных патологий занимают одно из первых мест среди причин смертности, временной нетрудоспособности и развития инвалидности. Именно поэтому вопросы регенеративной медицины в области восстановления костной ткани, внутренних органов и кожи методами тканевой инженерии не отделимы от изучения свойств стволовых клеток и их микроокружения.

В работе изучены возможности культивирования стволовых клеток на особых матриксах из синтетических и природных биоматериалов, где мезенхимальные стволовые клетки находятся в среде, приближенной к естественному окружению в организме. Использование таких матриксов и культивирование клеток млекопитающих *ex vivo* позволяет исследовать физиологию клеток и тканей, а также необходимо для практического использования стволовых клеток в регенеративной медицине

Автором впервые в отечественной литературе подобраны оптимальные условия для культивирования мышинных мезенхимальных стволовых клеток на матриксе из полимера поли(3-гидроксibuтирата), синтезированного микробиологическим биосинтезом штаммом-продуцентом *Azotobacter chroococcum* 7B, а также на примере этих стволовых клеток были продемонстрированы *in vitro* биосовместимость матрикса, что, несомненно, подтверждает тот факт, что выбранный полимерный матрикс подходит для длительного культивирования стволовых клеток.

Стволовые клетки, культивируемые на матриксе из полимера поли(3-гидроксibuтирата) не претерпевают трансформацию, сохраняя свой поверхностный фенотип, и меньше подвергаются старению, что подтверждает перспективность использования такого рода матрикса в тканевой инженерии для культивирования мезенхимальных стволовых клеток человека в клинических целях.

Автореферат грамотно структурирован, дает полное представление о цели, задачах исследования, методах их решения на основе полученных в ходе диссертационного исследования результатах. Автореферат отражает все этапы исследования, содержит достаточное количество исходных данных с пояснениями, рисунками и таблицами. Содержание автореферата изложено лаконично, аргументированно, выводы обоснованы.

Работа содержит большое количество ценных научных мыслей и практических рекомендаций, которые могут положены в основу дальнейших исследований. Материалы диссертации могут быть использованы в дальнейшем изучении свойств матриксов на основе поли(3-гидроксibuтирата) для длительного культивирования мезенхимальных стволовых клеток для их возможного дальнейшего применения в терапевтических целях в регенеративной медицине, а также в научно-исследовательских целях.

Анализ автореферата показывает, что диссертация представляет собой завершенное, концептуально оформленное исследование,

свидетельствующее о хорошей теоретической и практической подготовленности соискателя.

На основании автореферата можно судить о том, что диссертационная работа Натальи Вячеславовны Андреевой на тему «Долговременное культивирование мезенхимальных стволовых клеток мыши для тканевой инженерии» соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 — Биотехнология (в том числе Бионанотехнологии).

Декан биолого-химического
факультета ГОУ ВО МО
Московский государственный
областной университет,
Академик РАЕН,
к.х.н., доцент



Х.Б. Юнусов



11.05.2016

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации

Андреевой Натальи Вячеславовны

**«Долговременное культивирование стволовых клеток мышцы для
тканевой инженерии»,**

представленной на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

по специальности 03.01.06. – Биотехнология (в том числе
Бионанотехнолии).

Диссертационная работа Андреевой Н.В. посвящена одному из интенсивно развивающихся в последнее время направлений биотехнологии, связанному с разработкой методологии трехмерного культивирования стволовых клеток в объеме пористых полимерных носителей и с изучением особенностей поведения клеток при таком культивировании. Это направление исследований актуально как с научной, так и с прикладной точек зрения для развития клеточной и тканевой инженерии.

Целью работы диссертанта являлось изучение возможности длительного культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани мышцы на макропористых носителях, сформированных на основе поли(3-гидроксibuтирата). В задачи работы входило выявление оптимальных условий роста клеток, изучение увеличения клеточной массы и исследование особенностей замедления старения клеток в процесс их культивирования.

Актуальность именно данного исследования обусловлено тем, что изучение стволовых клеток не отделимы от медицинских проблем, таких как глубокие травмы, ожоги, переломы, хронические заболевания и т.п. , где требуются восстановления поврежденных органов и тканей.

Диссертантом подробно изучены возможности культивирования стволовых клеток на специально подобранных носителях, где стволовые клетки находятся в среде приближенные к их естественному окружению,

данные исследования нужны для использования стволовых клеток в предклинических исследованиях и клинической практике.

К достижением автора диссертации следует отнести впервые найденные оптимальные условия культивирования мезенхимальных стволовых клеток мыши на пористых подложках из поли(3-гидроксibuтирата).

В экспериментах была показана биосовместимость таких носителей, что несомненно указывает на их пригодность для длительного культивирования стволовых клеток. Так же отмечено, что во время длительного культивирования мезенхимальных стволовых клеток на подложках не претерпевают трансформацию; меньше подвергаются старению, по сравнению с контролем, где клетки культивировались на культуральном пластике.

Данные исследования дают возможность использовать подложки из поли(3-гидроксibuтирата) для длительного культивирования стволовых клеток с целью их возможного применения в тканевой инженерии и для научных исследований.

Автореферат хорошо структурирован, понятны цели, задачи исследования и методы их решения. Автореферат сопровождается рисунками и таблицами с достаточным количеством исходных данных и пояснений. Автореферат написан грамотно и аргументировано, все выводы обоснованы.

Помимо достоинств, есть еще замечания в работе, **которые не снижают ценность полученных в диссертации данных и сделанных автором выводов.**

К недостаткам рецензируемого автореферата можно отнести несколько тяжеловесный стиль изложения, а также бесчисленное количество раз использование термина «матрикс». Если в биологии понятия типа «межклеточный матрикс» является общепринятым, то по отношению к полимерным материалам, в число которых конечно входят и изделия на

основе поли(3-гидроксibuтирата), термин «матрикс» (фактически калька англоязычного слова matrix) в соответствующей отечественной научной литературе не употребляется вовсе. Обычно применяемыми в этой области науки и техники терминами являются слова «носитель» или «подложка».

В целом автореферат показывает, что диссертация Андреевой Н.В. представляет собой законченное, концептуально оформленное исследование, свидетельствующее о хорошей теоретической и практической подготовленности соискателя.

Полагаю, что диссертационная работа Андреевой Н.В. «Долговременное культивирование стволовых клеток мыши для тканевой инженерии» соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 — Биотехнология (в том числе Бионанотехнологии).

5.05.2016

Заведующий лаборатории криохимии биополимеров,
Федерального государственного бюджетного учреждения
Института элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова РАН

д.х.н., профессор



Лозинский В.И.

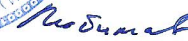
Адрес: 119991, Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, д.28

Телефон лаборатории: 8(499)135-64-92

E-mail: loz@ineos.ac.ru

Подпись Лозинского В.И. заверяю,
ученый секретарь ИНЭОС РАН,

д.х.н.

Любимов С.Е.

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Андреевой Натальи Вячеславовны на тему **«Долговременное культивирование стволовых клеток мышцы для тканевой инженерии»**, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 — Биотехнология (в том числе Бионанотехнологии).

Диссертация Андреевой Натальи Вячеславовны посвящена актуальной проблеме сохранения потенциала стволовых клеток при их культивировании в объеме.

В качестве тестируемого материала был выбран матрикс из полимера поли(3-гидроксibuтирата), синтезированного микробиологическим путем штаммом-продуцентом *Azotobacter chroococcum* 7В. Данный полимер обладает повышенной биосовместимостью, биodeградацией и экологически безопасен.

В методологическом исследовании Андреева Н.В. рассматривает поведение клеток при их культивировании на данном матриксе и обычном культуральном пластике.

В результате эксперимента были подобраны оптимальные режимы культивирования клеток в объеме, показано, что клетки, культивируемые на матриксе длительное время (около 2х месяцев), способны дольше сохранять жизнеспособность (по сравнению с клетками, культивируемыми на культуральном пластике).

Также в работе было отмечено, что при культивировании клеток на матриксе их размеры уменьшаются, что важно для направленной миграции клеток в пораженные органы.

В работе на примере мезенхимальных стволовых клеток мышцы достаточно подробно был описан основной подход к решению задач долговременного культивирования клеток и поддержания их жизнеспособности на протяжении длительного времени.

Данные, полученные автором, показывают, что биосовместимый матрикс, созданный из полимера поли(3гидроксibuтирата), является

оптимальным носителем для длительного культивирования мезенхимальных стволовых клеток.

В качестве замечания хочу отметить, что из рис. 3 и подрисуночной подписи (стр. 10 автореферата) не ясно, к каким образцам относятся термограммы нагрева и охлаждения. Видно, что температуры плавления и кристаллизации отличаются примерно на 8-10 °С. То есть это два разных образца.

В целом исследования Андреевой Н.В. вносят значительный вклад в развитие технологии культивирования клеток в объеме.

Автореферат написан достаточно подробно, все выводы обоснованы. Материалы работы опубликованы в 7-ми статьях на страницах изданий из списка ВАК РФ (в том числе одна статья в зарубежном издании).

В целом, диссертационная работа соответствует требованиям пунктов 9-11 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения учёных степеней» № 842 от 24 сентября 2013 г., а её автор Андреева Н.В. заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 «Биотехнология (в том числе и Бионанотехнологии)».

К.т.н., доцент, с.н.с.,
заместитель зав. лабораторией
«Диффузионных явлений
в полимерных системах» (№0313)
Института химической физики
им. Н.Н. Семенова РАН



Ольхов Анатолий Александрович



Собственноручную подпись
сотрудника Ольсоева А.А.
удостоверяю
Секретарь

10.05.2016г



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Андреевой Н.В.

на тему: «Долговременное культивирование мезенхимальных стволовых клеток мышцы для тканевой инженерии», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

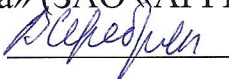
Успешное культивирование стволовых клеток является необходимым этапом в технологиях регенеративной медицины и тканевой инженерии, быстро развивающихся и чрезвычайно актуальных направлениях современной медицины. Работа Андреевой Натальи Вячеславовны, посвящена получению химически чистых биосовместимых полимерных матриксов, изучению воздействия матриксов на стволовые клетки и оптимизации условий культивирования клеток на этих матриксах. Работа представляется актуальной как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения. Автором было исследовано получение полимера поли (3-гидроксibuтирата) микробиологическим способом с помощью штамма продуцента *A. chroococcum* 7Б. Этот способ является экологически безопасным, и, в тоже время, относительно дешевым. Кроме того, в работе было исследовано долговременное культивирование мезенхимальных стволовых клеток мышцы в объеме. Проведенные исследования показали, что клетки, культивируемые в объемном матриксе, дольше сохраняли клеточный потенциал, по сравнению с контролем, где клетки культивировались на культуральном пластике. Также было изучено влияние культивирования в объемном матриксе на размер клеток. Размер клеток является важной характеристикой для клеточной терапии, поскольку известно, что при внутривенном введении клеток, большая часть их задерживается в мелких капиллярах и гибнет. Матриксы, полученные из полимера поли(3-

гидроксibuтирата) подходят для решения прикладных задач, таких как наращивание клеточной массы в больших объемах для клеточной терапии и биотехнологии (для получения цитокинов, белков, ферментов и т.п.).

Научная новизна и практическая значимость работы не вызывает сомнений. Объем экспериментальных исследований достаточен, использованные методики современны и адекватны поставленным целям и задачам. Выводы исследования соответствуют результатам диссертационной работы.

По материалам диссертации было опубликовано в 6 печатных работ в журналах рекомендованных ВАК РФ и 1 в зарубежном издании.

Диссертационная работа Андреевой Н.В. «Долговременное культивирование мезенхимальных стволовых клеток мыши для тканевой инженерии» соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Андреева Наталья Вячеславовна - заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.01.06 биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Старший научный сотрудник лаборатории № 2
Закрытого акционерного общества «Научно-исследовательский
институт Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ»)
кандидат биологических наук  Серебряный В.А.

10.05.2016

Адрес института: 117545, г. Москва, 1-ый Дорожный проезд, дом 1,
корпус 1.

Телефон лаборатории: +7-495-780-33-78 доб. (*) 404

e-mail: Vsevolod_Serebrianyi@agri.ru

Подпись Серебряного В. А. заверяю
Секретарь ЗАО «АГРИ»



Некошнова Е.И.
(ФИО)

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации *Андреевой Натальи Вячеславовны* на тему «*Долговременное культивирование стволовых клеток мыши для тканевой инженерии*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 — Биотехнология (в том числе Бионанотехнологии).

Диссертационная работа Андреевой Н.В. посвящена разработке метода долговременного культивирования стволовых клеток мыши. Эта тема очень актуальна в связи с активно развивающимся использованием стволовых клеток в медицине, тогда как мышь является наиболее используемым лабораторным животным в биомедицинских исследованиях, в том числе в доклинических исследованиях.

В основу работы положены исследования автора, связанные с подбором оптимальных условий при долговременном культивировании клеток (2D- и 3D-культивирование). В качестве носителя для клеток для их 3D-культивирования был использован пористый полимерный матрикс.

Диссертантом были подобраны подходящие режимы для культивирования стволовых клеток на модели мезенхимальных стволовых клеток мыши, выделенных из жировой ткани. В процессе эксперимента сравнивались параметры роста стволовых клеток мыши на объемном матриксе и культуральном пластике. В результате эксперимента было показано, что на матриксе клетки растут значительно быстрее, они меньше подвергаются старению и трансформации.

В целом, судя по автореферату, диссертационная работа представляет собой законченное научное исследование, результаты которого вносят значительный вклад в существующие знания об особенностях культивирования стволовых клеток в объеме на биосовместимом пористом матриксе. Разработанная автором методика может быть применена не только для тканевой инженерии, но и для биотехнологии и в других научных областях.

Несмотря на наличие некоторых неточностей (например, подписи на рисунке 12 перепутаны) и опечатки, работа была выполнена на должном научном и методическом уровне, выводы сделаны корректно и соответствуют поставленным целям. Результаты работы опубликованы в семи статьях, доложены на конференциях.

Считаю, что диссертационная работа Андреевой Натальи Вячеславовны «Долговременное культивирование мезенхимальных стволовых клеток мыши», соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 «Биотехнология (в том числе и Бионанотехнологии)».

Профессор Научно-образовательного Центра по биоинженерии,
зав. лаб. биохимии азотфиксации и метаболизма азота
Института биохимии им. А.Н. Баха РАН
Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии Наук,
Доктор биол. наук

А.Ф.Топунов



Подпись *Топунов*
ЗАВЕРЯЕТСЯ
Заведующий канцелярией
11 05 2016г.