

Отзыв

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Новиковой Светланы Петровны на диссертацию Андреевой Натальи Вячеславовны «Долговременное культивирование мезенхимальных стволовых клеток мыши для тканевой инженерии», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Актуальность избранной темы

Исследования со стволовыми клетками являются одним из современных направлений биомедицины. XX век ознаменовался рядом успешных достижений в молекулярной и клеточной биологии, в т.ч. открытием эмбриональных стволовых клеток.

В научном аспекте применение технологии стволовых клеток кажется безграничным, но отношение научного сообщества к замене или регенерации вышедших из строя органов с использованием стволовых клеток неоднозначно и, прежде чем методы терапии, основанные на применении стволовых клеток, войдут в медицинскую практику, нужно решить бесконечное множество задач как научных, так этических и юридических. После решения этих задач можно будет высказываться «за» или «против». Поэтому развитие исследований на эту тему продолжается довольно активно.

Представленная работа посвящена изучению вопросов, на каком матриксе и при каких условиях культивирования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) мыши можно удлинить продолжительность сохранения клеточного потенциала и сохранить жизнеспособность стволовых клеток.

Эта тема весьма актуальна для использования стволовых клеток в медицине и биотехнологии, поскольку через относительно короткое время культивирования (на культуральном пластике), клетки начинают стареть, в них

накапливаются мутации, нужен другой матрикс, кроме того, клетки нельзя выделить в больших количествах из-за низкой встречаемости в органах. Все эти проблемы затрудняют использование стволовых клеток в исследовательских и терапевтических целях.

В работе Н.В.Андреевой поставлены задачи:

- получение полимерного матрикса и исследование его морфологии и физико-химических свойств;
- подбор оптимальных условий культивирования МСК из жировой ткани мыши и сравнение параметров роста МСК на культуральном пластике и биополимерном матриксе;
- исследование изменения размеров МСК мыши при культивировании клеток на матриксе;
- оптимизация условий для наработки МСК мыши с целью сохранения их клеточного потенциала, жизнеспособности и замедления старения.

В качестве матрикса в данной работе был выбран полимер поли (3-гидроксibuтират) (ПГБ), поскольку он обладает высокой биосовместимостью, так как состоит из мономера 3-гидроксимасляной кислоты, который является клеточным продуктом метаболизма у человека и животных. В работе было исследовано, насколько пористый матрикс, полученный из ПГБ, подходит для длительного культивирования МСК на модели стволовых клеток мыши.

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

Все научные положения диссертации нашли свое отражение в ее тексте, формулировки выводов и рекомендаций приведены с опорой на экспериментальные и литературные данные. Их обоснованность, прежде всего, определяется значительным объемом экспериментальных данных: результатами анализа используемых в работе полимерных матриксов, результатами исследования по подбору условий культивирования МСК, количеством

проведенных тестирований клеток. Экспериментальные данные подтверждены ссылками на множество литературных источников.

Достоверность и новизна исследования, полученных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Центральной частью диссертации являются эксперименты по длительному культивированию клеток в объеме на пористых матриксах из ПГБ в сравнении с культуральным пластиком, и их тестированию. Именно эта часть подробно проанализирована в диссертации и является убедительной. Тестирование клеток и полимера ПГБ было выполнено корректно. Надежность полученных результатов подтверждается воспроизведением результатов в нескольких сериях экспериментов с применением специального оборудования. К научной новизне можно отнести разработку оптимальных условий и режимов культивирования клеток с сохранением их жизненного потенциала на полимерном матриксе из поли (3-гидроксibuтирата), полученного биотехнологическим путем.

Впервые определено влияние длительного культивирования на размеры МСК, скорость роста, старение. Новизной в работе является также получение и использование пористого ПГБ в качестве матрикса.

Значимость для науки и практики, полученных автором результатов

Работа, сделанная в рамках диссертации, является необходимой частью научного направления по созданию пористых матриксов из биосовместимых полимеров и разработки методик по культивированию стволовых клеток для биотехнологии и терапии. Такие методики представляют большую значимость для решения ряда биотехнологических задач, в частности, при использовании долговременного 3D-культивирования стволовых клеток на полимерном носителе. Особое значение такие методики долговременного культивирования МСК могут иметь или уже имеют для использования в биотехнологии (синтез гормонов, цитокинов), в экспериментальной и клинической медицине (лечение глубоких ран, переломов, регенерации костной ткани), в научных исследованиях

(дифференцировка клеток, перепрограммирование клеток с помощью введения генетических конструкций, изучение старения клеток и другое).

Важнейшее значение при разработке таких матриксов приобретает биоматериал, из которого он изготовлен, и микроструктура каркаса. Выбор методики получения пористых полимерных матриксов из ПГБ был обусловлен простотой и широким использованием «метода выщелачивания», что делает этот метод практически стандартным для получения 3D-матриксов с целью культивирования в объеме клеток млекопитающих и человека. Метод хорошо зарекомендовал себя и был отработан во множестве работ, где было продемонстрировано получение пористых полимерных матриксов и 3D-рост различных культур клеток на них. Выбранный метод обеспечивает также большую шероховатость внутренней поверхности пор, что может способствовать прикреплению и росту МСК в объеме матрикса и химическую чистоту полимера, что позволяет использовать полимер для биомедицинских целей, в т.ч. для культивирования клеток *in vitro*.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты и выводы работы рекомендуются для реализации методов длительного культивирования МСК с использованием в качестве полимерного носителя матриксов из ПГБ в биотехнологии (синтез гормонов, цитокинов, антител), в экспериментальной медицине (доклинические исследования на мышах в регенеративной медицине - лечение глубоких ран, переломов, дефектов костной и хрящевой ткани), в научных исследованиях (тканевая инженерия, дифференцировка клеток, генетическая инженерия клеток и др.).

Содержание диссертации, ее завершенность

Диссертация состоит из введения, основной части, которая включает в себя литературный обзор, материалы и методы, результаты экспериментов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Объем диссертации 120

страниц машинописного текста, список литературы содержит ссылки на 154 источника, иллюстрирована 36 рисунками и 5 таблицами.

Во введении четко сформулированы необходимость проведения исследований по долговременному культивированию стволовых клеток, создание подходящих подложек для 3D-культивирования. Цель работы сформулирована как решение задачи длительного культивирования МСК из жировой ткани мышцы на пористом матриксе из поли(3-гидроксibuтирата). Четко сформулированы объект и предмет исследования, базовые методы, положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая значимость работы.

В обзоре литературы всесторонне рассмотрены аспекты по получению биосовместимого матрикса и значения длительного культивирования МСК, как в биотехнологии, так и для медицины и тканевой инженерии, использования оптимальных режимов и условий культивирования МСК. Литературный обзор имеет описательный характер, в целом информация хорошо структурирована и имеет характер сборника литературных данных, необходимых для старта в решении поставленной задачи.

В разделе «Материалы и методы» указаны методы исследования, используемые экспериментальные материалы и оборудование, которые позволили автору полностью выполнить поставленные задачи.

В «Результатах и их обсуждении» описаны данные по исследованию поли(3-гидроксibuтирата), долговременному 3D-культивированию МСК мышцы, подбору оптимальных условий и режимов для роста клеток на биополимерном матриксе. Показано влияние длительного культивирования на уменьшение размеров МСК, большую выживаемость клеток, увеличение скорости их роста, замедление старения; МСК на матриксе из ПГБ не претерпевают трансформацию, т.е. сохраняют свой поверхностный фенотип. Поставленные в работе задачи решены:

- получен и исследован пористый матрикс на основе ПГБ;

- в качестве оптимальных условий предложены условия длительного культивирования МСК из жировой ткани мышцы и проведено сравнение параметров роста МСК с результатами на культуральном пластике;
- показано, что при разработанных оптимальных условиях культивирования на матриксе, можно регулировать размеры МСК.

В заключении показано, что проведенные исследования позволили автору подобрать условия и выявить ряд закономерностей по сохранению жизнеспособности и клеточного потенциала при длительном культивировании клеток.

Работу следует считать завершенной в полном объеме поставленных задач.

Достоинство и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе соискателя в целом

Работа отличается высокой практической значимостью. Видна хорошая практическая профессиональная подготовка автора в предметной области. Текст диссертации и реферат написаны доступным языком, хорошо иллюстрированы. Описание полученных данных сопровождается анализом близкого экспериментального материала из научных публикаций, что вызывает доверие к самой работе.

К недостаткам можно отнести только то, что:

1. В тексте довольно часто встречаются досадные опечатки. Нет пояснений в некоторых местах аббревиатуре, например «ММ».
2. Изображение матрикса на рис 6 и на рис. 17 повторяется.
3. В главе "Материалы и методы" п. 2.2.2.6 приведены физико-химические свойства ПГБ, взятые из литературных источников. Не вполне понятно, зачем эти данные указаны в Методике. В п. 2.4 расчет пористости полимерных матриксов проводится по изображениям на микроскопах. А другие, например, физические методы анализа пористости использовались?
4. Недостаточно подробно описан метод стерилизации полимерного матрикса для его использования в качестве подложки для клеток.

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

**Заключение о соответствии диссертации критериям,
установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней**

Автореферат отражает основное содержание диссертации, выводы и рекомендации, отвечает требованиям ВАК РФ.

Диссертация Андреевой Натальи Вячеславовны «Долговременное культивирование мезенхимальных стволовых клеток мышцы для тканевой инженерии» на соискание ученой степени кандидата биологических наук является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач оптимизации создания биосовместимого полимерного пористого матрикса и разработки оптимальных условий культивирования мезенхимальных стволовых клеток мышцы в объеме для биотехнологии, научных исследований и медицины. Выполненная работа соответствует требованиям п.9 «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Новикова Светлана Петровна,
доктор биологических наук, профессор,
ФГБУ «НЦССХ им. А.Н. Бакулева» Минздрава России

Новикова С.П. Новикова

Подпись доктора биологических наук, профессора С.П. Новиковой заверяю:

Ученый секретарь

ФГБУ «НЦССХ им. А.Н.Бакулева» Минздрава России,

д.м.н., профессор

11.05.2016 г.



Ярустовский

М.Б. Ярустовский

Сведение об официальном оппоненте

по диссертации Андреевой Натальи Вячеславовне «Долговременное культивирование мезенхимальных стволовых клеток мыши для тканевой инженерии», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе и бионанотехнологии).

Фамилия, имя, отчество	Новикова Светлана Петровна
Гражданство	Российская Федерация
Ученая степень (с указанием отрасли науки и научных специальностей и шифра, по которым защищена диссертация)	Доктор биологических наук, Специальность: 14.00.41 - трансплантология и искусственные органы, 02.00.06 – химия высокомолекулярных соединений Ученая степень: доктор биологических наук
Основное место работы	
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента на момент представления им отзыва	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н.Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес организации.	121552, Москва, Рублевское шоссе, дом 135
Телефон	8(495) 414-79-44
Адрес электронной почты:	spnovikova@bakulev.ru
Должность	Зав. лабораторией химии и технологии материалов для сердечно-сосудистой хирургии

Список публикаций:

1. Л.А. Бокерия, С.П. Новикова, О.Л. Бокерия, В.И. Костров, Р.Р. Салохединова, Л.Н. Николашина, О.В. Шустрова, В.С. Сивцев. Пленочные композиции на основе желатина, структурированные разными способами // Бюллетень НЦССХ имени А.Н. Бакулева РАМН. – 2014. – Том 15, №4.
2. Л.А. Бокерия, С.П. Новикова. Биорезорбируемая гидрогелевая полимерная композиция с биологическими активными веществами (варианты) / Патент RU, 2014, 2519103.
3. Иванцова Е.Л., Косенко Р.Ю., Иорданский А.Л., Роговина С.З., Филатова А.Г., Гумаргалиева К.З., Новикова С.П., Берлин А.А. Пролонгированный транспорт и структура в системе биodeградируемый поли (R-3-гидроксибутират) – лекарственное вещество (рифампицин) // Высокомолекулярные соединения. ISSN 0507-5475. – М: Издательство Наука / Интерпериодика МАИК – 2012. – Серия А. – Т.54, №2 – С. 215-223.

Ученый секретарь
ФГБУ «НЦССХ им. А.Н. Бакулева» Минздрава России,
д.м.н., профессор 11.05.16

дата



М.Б. Ярустовский

Отзыв

официального оппонента Ходаровича Юрия Михайловича
на диссертацию Андреевой Натальи Вячеславовны
на тему: «ДОЛГОВРЕМЕННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ
ИНЖЕНЕРИИ», предоставленной на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальностям: 03.01.06 – Биотехнология (в том
числе бионанотехнологии).

Диссертация Андреевой Натальи Вячеславовны посвящена
долговременному культивированию мезенхимальных стволовых клеток
(МСК) мыши в объеме на биосовместимом пористом матриксе из поли(3-
гидроксibuтирата), полученного микробиологическим путем.

МСК в настоящее время являются, пожалуй, наиболее часто
используемым типом клеток для клеточной терапии и тканевой инженерии.
Однако наработка достаточного для медицинского использования
количества МСК является непростой задачей из-за ограничения по
количеству делений этих клеток в культуре. Особенно это актуально для
пожилых пациентов, так как количество МСК и их пролиферативный
потенциал снижаются с возрастом. В ряде протоколов это приводит к тому,
что не удаётся нарастить аутологичный клеточный материал в
необходимых для терапии количествах. Даже небольшое увеличение
количества пассажей МСК в культуре может привести к многократному
увеличению выхода конечного клеточного материала, что, несомненно,
представляет интерес с практической точки зрения. Таким образом,
совершенствование технологии культивирования МСК является
актуальной задачей.

В качестве объекта исследования была выбрана модель МСК мыши.
Эти животные широко используются при проведении доклинических
исследований, при разработке различных медицинских изделий и
лекарственных препаратов. Важным является тот факт, что МСК мыши

намного более доступны для исследования, чем МСК человека. Можно надеяться, что полученные авторами результаты, а также разработанные методы и подходы будут в будущем использованы и для улучшения культивирования МСК человека, что, несомненно, интересно с точки зрения применения данной технологии в медицине. Таким образом, изучение культивирования МСК мышцы на различных носителях и улучшение существующей технологии культивирования представляется актуальной задачей.

Во «Введении» диссертант показывает актуальность и необходимость проведения исследований по долговременному культивированию стволовых клеток и созданию подходящих матриц для их культивирования. Автор также подробно обосновывает необходимость долговременного культивирования стволовых клеток в объеме на био - совместимом полимерном матриксе.

Приводятся обязательные для диссертационной работы разделы: актуальность и новизна исследования, научная значимость, выводы, список литературы, сведения о публикациях, вышедших по материалам работы.

Обзор литературы представлен как последовательное и подробное изложение истории изучения, систематического положения и особенностей биосовместимых полимеров, в том числе полимера ПГБ, описаны области применения МСК в медицине и в научных исследованиях.

В «Результатах» диссертант описывает получение и физико-химические свойства матрикса на основе ПГБ. Подробно изучено 3D-культивирование стволовых клеток, подобраны оптимальные условия для долговременного культивирования стволовых клеток на модели МСК мышцы. Впервые было показано, что при долговременном культивировании МСК мышцы в объеме снижается скорость репликативного старения клеток. Также было показано, что, при культивировании клеток на матриксе, происходит изменение размеров клеток.

Выводы обоснованы, написаны кратко, лаконично и соответствуют поставленной цели диссертационной работы.

В целом, диссертация Н.В. Андреевой является фундаментально-прикладным исследованием длительного культивирования стволовых клеток в объеме с использованием ПГБ в качестве полимерного матрикса.

Высоко оценивая полученные Н.В. Андреевой результаты, к тексту диссертации имеется ряд замечаний и вопросов:

1) В тексте часто встречаются неточности, например: "Направленная дифференцировка МСК мыши в остеогенную и адипогенную дифференцировку" или " По теме диссертации опубликовано 7 статей в журналах, рецензируемых ВАК РФ" - ВАК не рецензирует журналы.

Встречаются повторы текста - так, на страницах 7 и 65 диссертации довольно большой общий фрагмент о перспективности и целесообразности работы.

2) Очень много ошибок в главе "Результаты", например:

Два разных рисунка подписаны как номер 10, рисунок номер 9 подписан как номер 12, нет подписей под картинками в правой колонке рисунка 9 (в отличие от первых трёх колонок), подпись под рисунком гласит " ...на полимерном матриксе (правая колонка) и культуральном пластике (левая колонка)", что не соответствует действительности: колонок четыре, полимерный матрикс в 1й и 3й колонке, пластик - во 2й и 4й).

В эксперименте по определению оптимальной плотности посева использовались только два разных количества высеваемых клеток (стр. 71-72, рис 13). После чего делается вывод, что оптимальная плотность посева - средняя (какая?), и почему-то идёт ссылка на рисунок 14, не имеющий к этому эксперименту прямого отношения. Далее идёт утверждение, что клетки сохраняли "свои свойства: колониальнообразующую активность, иммуносупрессивные свойства, дифференцировочный потенциал". При этом не приводятся экспериментальные данные, подтверждающие это (особенно интересны тесты на определение иммуносупрессивной активности).

Доверительный интервал, нарисованный на столбцах на рисунке 13, не соответствует подписям над столбцами. Если верить графическому изображению доверительного интервала, то возникает сомнение в статистической достоверности отличий постоянной деления на рисунках А и Б.

3) Часть представленного иллюстративного материала недостаточно наглядна:

Так, на странице 68 приводятся картинки окрашивания красителями при остеогенной и адипогенной дифференцировке. Для непрофессионала трудно оценить, насколько прошла дифференцировка, не видя контрольных не дифференцированных клеток и зрелых дифференцированных клеток, окрашенных теми же красителями.

На рисунке 11в приводится фотография выделенных МСК из жировой ткани, однако качество фотографии настолько плохое, что клетки невозможно разглядеть.

На рисунках 21-25 показаны фотографии, иллюстрирующие рост МСК в объёме и изменение их плотности в ходе долговременного культивирования. Я не смог уверенно увидеть клетки на этих фотографиях и определить, как меняется их количество при культивировании.

4) В пункте 3.1 указано, что ПГБ был выбран в качестве матрикса для культивирования МСК потому, что в лаборатории была "получена документация по его биомедицинскому использованию и накоплена обширная база данных по его физико-химическим и биологическим свойствам". Далее идёт глава, посвящённая изучению физико-химических свойств ПГБ. Непонятно в этом случае, являются ли данные, приведённые в пункте 3.1 данными, полученными непосредственно автором.

5) В диссертации приводятся сравнения культивирования МСК на ПГБ и культуральном пластике. Из литературного обзора не совсем понятно, использовались ли какие-нибудь другие 3D матриксы для культивирования МСК другими авторами. Если да, то хотелось бы понять, в чём

преимущество использования ПГБ и, желательно, увидеть сравнение результатов культивирования (хотя бы на уровне сравнения литературных данных).

Данные замечания не уменьшают ценность полученных результатов. Данные, полученные автором, дополняют наши знания о биосовместимых материалах для тканевой инженерии, раскрывают особенности длительного культивирования стволовых клеток с сохранением их жизненного потенциала, что может быть полезно как для биотехнологии, так и для медицины.

Диссертация Н.В. Андреевой «Долговременное культивирование мезенхимальных стволовых клеток мыши» является актуальной законченной работой.

Автореферат диссертации Н.В. Андреевой полно отражает содержание работы и полученные результаты.

Материалы, изложенные в диссертации, в полной мере отражены в публикациях. По материалам диссертации опубликовано 7 статей в рецензируемых журнал из списка ВАК РФ, в том числе и на английском языке в международном рецензируемом журнале.

Диссертационная работа Н.В. Андреевой соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Андреева Наталья Вячеславовна, заслуживает присвоение ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Ходарович Юрий Михайлович,

кандидат биологических наук, научный сотрудник,
ФГБУ института биоорганической химии имени академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН



Ю.М.Ходарович.

Подпись кандидата биологических наук, научного сотрудника, ФГБУ ИБХ имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН Ю.М. Ходаровича заверяю:

Ученый секретарь

ФГБУ ИБХ имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

д.ф-м.н.,



В.А. Олейников.

(дата)

10.05.16



Сведение об официальном оппоненте

по диссертации Андреевой Натальи Вячеславовне «Долговременное культивирование мезенхимальных стволовых клеток мыши для тканевой инженерии», предоставленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе и бионанотехнологии).

Фамилия, имя, отчество	Ходарович Юрий Михайлович
Гражданство	Российская Федерация
Ученая степень (с указанием отрасли науки и научных специальностей и шифра, по которым защищена диссертация)	Кандидат биологических наук, Специальность: молекулярная биология Ученая степень: кбн
Основное место работы	
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента на момент представления им отзыва	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии Наук
Адрес организации.	117997, Российская Федерация, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, дом 16\
Телефон	8(495)3306465
Адрес электронной почты:	khodarovich@mail.ru
Должность	научный сотрудник

Список публикаций:

1. Shishova K.V., Khodarovich Y.M., Lavrentyeva E.A., Zatsepina O.V. High-resolution microscopy of active ribosomal genes and key members of the rRNA processing machinery inside nucleolus-like bodies of fully-grow mouse oocytes // Exp. Cell Res. – 2015. – Vol. 337 (2). – P. 208-218
2. Shishova K.V., Khodarovich Y.M., Lavrentyeva E.A., Zatsepina O.V. Analis of the Localization of Fibrillarin and Sites of Pre-rRNA Synthesis in the Nucleolus-Like Bodies of Mouse GV Oocytes after Mild Treatment with Proteinase K // Ontogenes. – 2015. – Vol. 46(3). – P. 162-173. (Russian).
3. Ковина М.В., Зильберман Л., Ходарович Ю.М. Изучение дифференцировки эмбриональных стволовых клеток при длительном кокультивировнии с адипоцитами // Биомедицина. – 2013. – Т. №4. – С. 107-113.

Ученый секретарь

ФГБУ ИБХ имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

д.ф-м.н.,



10.05.16 (дата)

В.А. Олейников.