

## **ОТЗЫВ**

**Официального оппонента доктора биологических наук, профессора Гуляевой Людмилы Федоровны на диссертационную работу Трифоновой Кристины Эдуардовны «Особенности распределения штамма мезенхимальных стволовых клеток в условиях опухолевого роста после сингенной трансплантации мышам линии *C57BL/6*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)**

**Актуальность диссертационного исследования.** В настоящее время клеточные технологии являются важной составляющей научных исследований в биологии и медицине. Область применения таких исследований достаточно широка: от изучения фундаментальных механизмов биологических процессов до применения в практической медицине. Особый интерес представляет использование мезенхимальных стволовых клеток человека (МСК) для доставки различных анти-раковых агентов, что связывают с увеличением биодоступности препаратов, их адресной доставкой, а также снижением токсического действия. Однако многие аспекты использования таких технологий, в частности, способ введения МСК, источники получения, распределение их по различным органам остаются до конца неисследованными. Поэтому поставленная цель диссертационной работы Трифоновой К. Э., направленная на исследование особенностей распределения МСК после внутривенной трансплантации в условиях опухолевого роста на модели меланомы B16-F10, несомненно, является актуальной и востребованной для современной науки.

**Соответствие содержания и оформления диссертации правилам ВАК.** Диссертационная работа Трифоновой К. Э. изложена на 105 страницах. Она состоит из введения, глав обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов исследования, выводов, списка сокращений, списка использованной литературы, включающего 141 работу преимущественно иностранных

авторов. Полученные в результате проведенного исследования данные приведены в 20 рисунках.

Во введении автор обосновывает актуальность выбранного исследования, на основании чего формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, практическую значимость полученных результатов, а также положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы, занимающий 23 стр., посвящен анализу биологических свойств мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, их миграционной активности, их влиянию на опухолевый рост. Здесь приведена детальная характеристика методов противоопухолевой терапии с применением МСК, включая таргетную доставку различных химических и биологических агентов. Отдельной главой представлена информация о распределении МСК после трансплантации и способах их визуализации в организме реципиента после трансплантации. В целом, в обзоре представлены научные результаты по проблеме использования МСК, как средства доставки фармакологических агентов. Обобщая приведенные данные научной литературы, автор справедливо указывает на необходимость проведения дальнейших экспериментов для разработки безопасных клинических протоколов клеточной терапии различных заболеваний человека.

Материалы и методы исследования адекватны поставленной цели и решаемым задачам. В работе использованы традиционные методы клеточной биологии: выделение МСК из костного мозга и их культивирование, культивирование опухолевых клеток В16-F10. Для решения поставленных задач была осуществлена индукция адипогенной и остеогенной дифференцировки МСК. Для анализа используемых клеток использовали проточную цитометрию, световую и флуоресцентную микроскопию, для анализа специфической последовательности гена zinc finger protein 2 Y хромосомы (Zfy2) использовали метод ПЦР. В целом, диссертационная работа Трифионовой К. Э. выполнена на высоком научно-методическом уровне.

В главе «Результаты исследования» приведены полученные автором результаты, включающие получение штамма клеток МСК из костного мозга мышей линии *C57BL/6*. Полученные клетки имели фибробластоподобную морфологию и иммунофенотип. Они обладали способностью адгезироваться к пластику при стандартных условиях культивирования, а также дифференцироваться в адипогенном и остеогенном направлении. В этой главе приведены основные результаты, описывающие свойства полученной культуры, ее способность влиять на опухолевый рост и на выживаемость животных – носителей опухоли. Полученные результаты изложены логично и последовательно, хорошо иллюстрированы.

В заключении автор обсуждает полученные результаты, сопоставляя их с данными других авторов.

#### **Степень достоверности и обоснованности полученных результатов.**

Диссертационная работа Трифионовой К. Э., посвященная получению и характеристике мезенхимальных стволовых клеток мышей, а также исследованию их миграционной способности на модели мышей с привитой меланомой, является законченным, научным исследованием, выполненном на высоком методическом уровне. В этом исследовании большая часть экспериментов выполнена лично автором. Полученные результаты обработаны с использованием современных методов статистики. Поэтому достоверность и обоснованность полученных автором результатов не вызывает сомнения.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на 7 престижных всероссийских научно-практических конференциях и форумах.

По результатам диссертации опубликовано 4 статьи, 3 из них – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации результатов диссертационных исследований. Выводы диссертации соответствуют цели, задачам и основным положениям. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

## **Научная новизна и практическая значимость результатов диссертационного исследования.**

Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнения. Многие результаты экспериментальных исследований Трифионовой К. Э., действительно, получены впервые. Автором впервые получен штамм мезенхимальных стволовых клеток костного мозга мышей линии *C<sub>57</sub>BL/6*, который отвечает всем требованиям, необходимым для характеристики таких клеток. Автором впервые установлены особенности распределения штамма мезенхимальных стволовых клеток в условиях опухолевого роста после сингенной трансплантации мышам линии *C<sub>57</sub>BL/6*. Практическим результатом исследования было также пополнение коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» новым штаммом мезенхимальных стволовых клеток, охарактеризованным в соответствии с требованиями к диплоидным и перевиваемым культурам клеток. Разработана стандартная операционная процедура «Выделение мезенхимальных стволовых клеток костного мозга мышей линии *C<sub>57</sub>BL/6*», которая внедрена в работу отдела клеточных технологий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВПО Новосибирского государственного педагогического университета (Новосибирск).

### **Общие замечания по диссертационной работе**

1. В цитированиях обзора литературы (стр. 14-16) автор ссылается на работы 2006-2008 гг., говоря о них, как результатах последних лет. Хотелось бы увидеть также работы последних лет. Например, в исследовании Park et al., 2015 приводятся новые данные о доставке интерферона-бэта в комбинации с темозоломидом с помощью МСК для терапии глиомы.
2. Из работы не ясно, почему суспензия МСК вводилась на 3-и сутки после введения самкам мышей суспензии клеток меланомы B16-F10.



Можно предположить, что в этом случае стволовые клетки влияли на прививаемость опухоли?

3. Из работы не ясно, где у мышей развивалась меланома, как регистрировалась опухоль и околоопухолевые лимфатические узлы, где оценивалось присутствие МСК?

Приведенные выше вопросы носят дискуссионный характер и не снижают моей высокой оценки выполненной работы.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Результаты, полученные при выполнении диссертационной работы Трифоновой К. Э., без сомнения, представляют интерес для научно-исследовательских учреждений, занимающихся проблемами использования клеточных технологий для научно-исследовательских работ и в медицинских целях.

Предложенный соискателем метод получения мезенхимальных стволовых клеток, а также способы их анализа, могут быть использованы в научно-исследовательских учреждениях, занимающихся проблемами клеточной биологии и клеточной биотехнологии. Использование результатов исследования, полученных Трифоновой К. Э., представляется также целесообразным для биохимиков, онкологов, генетиков и молекулярных биологов.

**Заключение.** Диссертационная работа Трифоновой Кристины Эдуардовны «Особенности распределения штамма мезенхимальных стволовых клеток в условиях опухолевого роста после сингенной трансплантации мышам линии *C57BL/6*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, выполненная под руководством к.м.н. Нечаевой Елены Августовны и д.м.н. Повещенко Александра Федоровича, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится

решение задачи, имеющей существенное значение для современной биотехнологии – получение и характеристика мезенхимальных стволовых клеток мышей. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте изложения материалов в рецензируемых печатных научных изданиях работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждения ученых степеней» (утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автору Трифоновой Кристины Эдуардовны следует присудить ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

**Официальный оппонент**

доктор биологических наук,  
профессор, руководитель  
лаборатории молекулярных  
механизмов канцерогенеза  
Федерального государственного  
бюджетного научного учреждения  
«Научно-исследовательский  
институт молекулярной биологии и  
биофизики»  
630117, Россия, г. Новосибирск,  
ул. Тимакова, 2/12,  
Тел. 8(383) 335-98-47  
imbb@niimbb.ru  
<http://niimbb.ru>



Гуляева Людмила  
Федоровна

Подпись профессора Гуляевой Л.Ф.  
заверяю:  
Ученый секретарь, к.б.н.



Сафронова  
Ольга Геннадьевна

1 февраля 2016 г.