

## ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Божокина Михаила Сергеевича на тему: «Модификация культуры мезенхимных стромальных клеток для клеточно-инженерного замещения дефектов гиалинового хряща», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.22. Клеточная биология

Разработки регенеративных стратегий в отношении хрящевой ткани имеют сегодня чрезвычайную востребованность, так как хрящевая ткань является одной из наиболее часто травмируемых и в то же время одной из самых плохо восстанавливаемых в организме человека. В связи с этим тема диссертации Михаила Сергеевича Божокина представляется весьма актуальной. Работа посвящена исследованию возможности модификации мезенхимных стромальных клеток с целью последующего их использования в тканеинженерных конструкциях.

Целью работы было проанализировать сравнительную эффективность различных невирусных методов модификации первичной культуры мезенхимных стромальных клеток (МСК) для использования внутри клеточно-инженерной конструкции при замещении поверхностных дефектов гиалинового хряща.

Впервые произведено сравнение эффективности различных методик невирусной модификации клеточной культуры МСК, таких как использование рекомбинантного белка TGF- $\beta$ 3, созданной рекомбинантной плазмиды, несущей ген *tgfb3*, а также произведено изучение сравнительной эффективности модификации клеточной культуры с помощью низкоинтенсивного когерентного лазерного излучения с длиной волны 632,8 нм. Впервые изучено сравнение эффективности данных методик и проанализирована возможность их применения в ограниченной клинической практике. В работе впервые была исследована принципиальная возможность и эффективность дальнейшего применения модифицированной данными способами клеточной культуры в составе биodeградируемой клеточно-инженерной конструкции при имплантации в область созданного повреждения коленного сустава экспериментального животного.

Научная новизна работы заключается в разработке оригинального устройства для создания стандартизированных повреждений коленного сустава крысы и получен патент РФ (RU 175628 U1). Также с участием автора работы разработано оригинальное устройство для совмещения биodeградируемого носителя и культуры клеток и получен патент РФ (RU 190863 U1).

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в расширении имеющихся знаний и наработок по восстановлению гиалинового хряща после имплантации опытной клеточно-инженерной конструкции. Продемонстрирована динамика дегенеративных процессов на поверхности гиалинового хряща в зависимости от первоначально созданного повреждения. По анализу результативности исследуемых методик модификации показана низкая эффективность трансфекции клеточной культуры МСК, недостаточная для использования внутри клеточно-инженерной конструкции. Автор работы приходит к выводу о том, что полученная конструкция с выбранной системой модификации рекомбинантным белком TGF- $\beta$ 3 может быть использована для замещения поверхностных дефектов гиалинового хряща у более крупных экспериментальных животных, а также в

ограниченной клинической практике. Метод и оборудование для изготовления клеточно-инженерной конструкции могут быть использованы для создания аналогичных конструкций и проведения дальнейших экспериментов *in vitro* и анализа экспериментальной эффективности альтернативных способов модификации клеточной культуры.

Диссертация изложена на 128 страницах по традиционному плану и состоит из следующих разделов: Оглавление, Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, семь глав Результаты собственных исследований, Обсуждение результатов, Выводы, Список литературы и Приложение. В список литературы включен 228 источник. Работа иллюстрирована семью таблицами и 38 рисунками. Приложение к диссертации содержит 8 страниц.

В целом работа последовательно и логично изложена понятным языком, В обзоре литературы приведены основы строения гиалинового хряща и методов его восстановления. Подробно и ясно изложен раздел обзора, посвященный факторам семейства TGF-beta. Особое внимание уделено влиянию цитокина TGF- $\beta$ 3 на экспрессию гена *col2a1*. Также уделено внимание вопросу регулирования экспрессии генов внеклеточного матрикса с помощью микро-РНК.

Раздел, посвященный материалам и методам представляет особенный интерес, так как автором подробно описаны клеточно-инженерные конструкции, разработанные в ходе выполнения диссертационного исследования. Раздел написан подробно, приведены иллюстрации хорошего качества, и в целом этот раздел не оставляет сомнений в том, что автор владеет всеми методиками, описанными в исследовании.

Раздел, посвященный результатам, полученным в работе, также изложен достаточно подробно. В том числе изложены и неудачи при выполнении экспериментов. Это является очень важным моментом, так как необходимо понимать, что первичные культуры очень плохо поддаются генетической модификации, и это часто становится серьёзным препятствием для разработок с использованием МСК.

Раздел, посвященный обсуждению полученных результатов, написан исходя из задач и полученных в работе данных. Обсуждаются все аспекты работы и полученные результаты в свете работ других авторов.

Поставленная в работе цель и конкретные задачи достигнуты. В работе использовались оригинальные запатентованные разработки: устройство для формирования стандартизированных дефектов хрящевой поверхности суставов в эксперименте и устройство для совмещения клеточной культуры и биodeградируемого носителя, а также осуществлена имплантация опытной клеточно-инженерной конструкции на основе предварительно модифицированных клеток под действием цитокина Tgf $\beta$ 3 в модели созданного стандартизированного повреждения поверхностного слоя гиалинового хряща крысы и получены данные об эффективности такой имплантации для его восстановления. Результаты прошли апробацию на нескольких конференциях, по теме работы опубликовано 9 статей в ведущих рецензируемых научных изданиях, в том числе, 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК для соискателей кандидатских диссертаций, 3 – в изданиях,

входящих в SCOPUS, 2 - в изданиях, реферируемых Web of Science, а также 2 патента на полезную модель.

Большим достоинством работы является ее потенциальная практическая значимость для регенеративной медицины, что отражено в подробном обсуждении результатов исследования и отражает высокую квалификацию автора, как специалиста в данной области.

К замечаниям по работе можно отнести большое количество опечаток в тексте. Также при прочтении работы возникли следующие вопросы.

1. Чем объясняется падение экспрессии sox9 и tgf beta-3 на 14 день на рис. 3.4.4?
2. Каковы перспективы невирусной модификации МСК? Есть ли клинические примеры использования невирусной модификации МСК?

Диссертация Божокина Михаила Сергеевича на тему: «Модификация культуры мезенхимных стромальных клеток для клеточно-инженерного замещения дефектов гиалинового хряща» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Божокин Михаил Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.22. Клеточная биология. Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не обнаружено. В Диссертации соискатель ссылается на источники цитирования материалов или отдельных результатов, включая собственные работы, выполненные в соавторстве с коллегами. Диссертация М.С.Божокина на соискание ученой степени кандидата биологических наук, несомненно, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития современных технологий клеточной инженерии, а также конкретные решения и разработки, направленные на внедрение достижений регенеративной биологии в практику терапии дегенеративных нарушений гиалинового слоя суставных поверхностей, что имеет существенное значение для развития современной медицины.

Член диссертационного совета,  
доктор биологических наук,  
доцент кафедры эмбриологии  
биологического факультета  
СПбГУ



Анна Борисовна Малашичева