

**ОТЗЫВ официального оппонента  
на диссертацию на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук Примака Александры  
Леонидовны на тему: «Создание культуры иммортализованных  
мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека  
для задач регенеративной биомедицины»  
по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия**

**Общая характеристика работы и актуальность  
исследования**

Представленная к защите диссертационная работа А.Л. Примака посвящена решению практической задачи - реализации возможности создания культуры мезенхимальных стволовых клеток (МСК), обладающих свойствами первичного клеточного материала и способных поддерживать свои свойства при длительном ведении клеточной культуры. Безусловная актуальность данной тематики заключается в том, что МСК активно используются в регенеративной медицине с целью восстановления функции поврежденных органов и тканей, а также в экспериментальной клеточной биологии при исследовании рецепторных, сигнальных, генетических и эпигенетических механизмов, определяющих активность клеток и возможности их участия в физиологических и патофизиологических процессах на клеточном и организменном уровнях.

Основным недостатком первичных клеточных культур, снижающим успешность их клинического и экспериментального применения, является высокая вариабельность их свойств, зависящая от индивидуальных особенностей донора, условий выделения и культивирования клеток и т.д. В связи с этим попытки получения иммортализованных «бессмертных» культур МСК представляются весьма актуальными в плане стандартизации их

чувствительности к активаторам различной природы, генетическим характеристикам, спектру секретируемых факторов, и способности к регуляции биологических процессов.

В ходе выполнения работы автор осуществил трансдукцию первичных культур МСК жировой ткани лентивирусным конструктом, несущим ген каталитической субъединицы теломеразы (hTERT). В полученных клеточных культурах был проведен анализ экспрессии гена hTERT, а также белковой каталитической субъединицы теломеразы. Оценка пролиферативной активности трансдуцированных МСК (МСКtert), показала, что пролиферативный потенциал этих клеток сохраняется при более длительном культивировании, чем у первичных МСК; при этом МСКtert, в отличие от коммерческой культуры ASC52telo, сохраняют контактное торможение, свидетельствующее о сохранности контроля над клеточным циклом.

В ходе анализа репликативного клеточного старения, проведенный по измерению активности ассоциированной с сенсацией  $\beta$ -галактозидазы (SA- $\beta$ -Gal) было обнаружено, что клеточное старение культур МСКtert развивается при значительно более поздних пассажах, чем в первичных МСК. Проведенный анализ способности МСК дифференцироваться в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении показал, что лишь одна из трансдуцированных в ходе исследования культур (обозначенная автором как МСКtert-2) сохраняла способность к дифференцировке, свойственную первичным МСК, снижая способность к остеогенной и адипогенной дифференцировке на более поздних пассажах. Полученные автором трансдуцированные культуры МСК превосходили коммерческую линию ASC52telo по способности к адипогенной дифференцировке.

С помощью проточной цитометрии было показано, что вирусная трансдукция сохраняла МСК-специфичный фенотип МСК<sub>tert-2</sub> (экспрессия CD73 CD90 сохранялась вплоть до 40 пассажа, однако после 44 пассажа снижалась экспрессия СВ105), при отсутствии маркеров иммунных и гаматопозитических клеток. Оценка гормональной чувствительности МСК<sub>tert-2</sub> выявила её сохранность вплоть до 40 пассажа, и потерю этой чувствительности у клеток ASC52telo при длительном пассировании. Проведенное автором кариотипирование не обнаружило изменений в составе хромосом в исходном фенотипе и при пассировании клеток. Проведенный протеомный анализ показал, что лентивирусная трансдукция первичных культур МСК частицами, несущими последовательность кДНК *hTERT*, не привела к выраженным изменениям качественного состава секрета, а также отсутствие в секрете белка теломеразы. Анализируемый автором спектр факторов роста и цитокинов при культивировании МСК<sub>TERT</sub> практически не менялся.

Валидация биологической активности секрета первичных МСК и МСК<sub>tert-2</sub>, проведенная в *in vitro* модели нейритогенеза сенсорных дорсальных ганглиев мыши показала, что продукты секреции обеих клеточных культур вызывают стимуляцию образования нейритов. В модели фиброза было продемонстрировано, что содержание  $\alpha$ -SMA (гладкомышечного актина) в лизатах дифференцировавшихся в миофибробласты фибробластов, а также количество стресс-фибрил, в которые встроился  $\alpha$ -SMA, было значительно ниже, чем в клетках, культивируемых в дифференцировочной среде без добавления секрета. Кроме того, автором было выявлено отсутствие трансформирующей активности секрета МСК<sub>tert-2</sub> в отношении первичных фибробластов дермы

человека, свидетельствующее об отсутствии трансформирующей активности.

В целом, проведенный автором систематический анализ основных свойств и регуляторных активностей МСК в культуре МСК<sub>tert</sub> продемонстрировал сохранность этих характеристик при многократном пассировании, свидетельствующую о высокой стабильности трансдуцированных клеток.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

В работе А.Л. Примака впервые проведен систематический анализ основных свойств культуры МСК жировой ткани, экспрессирующих каталитическую субъединицу теломеразы, с учетом их клеточной идентичности, структурных и функциональных свойств, секреторной активности, способности к их сохранению в процессе длительного культивирования и пассирования. Впервые изучено влияние сверхэкспрессии *hTERT* на чувствительность МСК жировой ткани человека к гормональным стимуляторам. Проведена оценка основных параметров, характеризующих развитие клеточной сенесценции в процессе культивирования и пассирования МСК<sub>tert</sub> (пролиферативная активность, экспрессия специфического маркера - ассоциированной с сенесценцией  $\beta$ -галактозидазы, развитие сенесценс-ассоциированного секреторного фенотипа (SASP)). Проведена оценка биологической активности секрета МСК<sub>tert</sub> (способность стимулировать нейритогенез, антифиброзная активность), доказано отсутствие трансформирующей активности секрета.

Все эти параметры были оценены в процессе длительного культивирования клеток. В результате проведенной работы получены приоритетные данные, характеризующие основные

свойства и регуляторную активность МСКtert как клеточного препарата, имеющего перспективы к использованию в качестве терапевтического средства для получения больших объемов биологически активного секрета.

### **Степень обоснованности положений, выносимых на защиту, научных выводов и рекомендаций**

Положения, выносимые на защиту, в целом хорошо обоснованы экспериментальными данными, полученными с использованием современных методов клеточной биологии, биохимического молекулярно-биологического и генетического анализа. Для решения поставленных задач автор активно использовал современные компьютерные программы, позволяющие получать количественные характеристики исследуемых параметров. Основным логическим звеном, обусловившим успех данного исследования, является комплексный подход к анализу данных, позволивший систематизировать экспериментальный материал, а также наличие тщательно спланированного протокола исследования.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из Введения, четырех основных глав («Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение»), заключения, выводов, списка литературы и приложения. Диссертация изложена на 169 страницах, содержит 11 таблиц, 33 рисунка. Список литературы содержит 316 источников, из них 21 отечественный и 295 зарубежных.

### **Степень достоверности полученных результатов**

Достоверность полученных автором результатов определяется следующими факторами.

Проведенный автором глубокий анализ отечественных и западных научных источников (изложенный в главе Обзор литературы) позволил сформулировать цель и задачи, адекватно выбрать объект и методы исследования. В ходе работы были проведены серии независимых научных экспериментов с необходимым числом повторов. Для увеличения достоверности результатов проводились эксперименты с использованием разных методов. Результаты были статистически обработаны с помощью современных программ GraphPad Prism 10 и MS Excel 16.93 и критически проанализированы, что позволило получить обоснованные выводы.

В главе «Материалы и Методы» автор дает информацию об использованных в работе экспериментальных подходах в форме, позволяющей провести оценку достоверности и надежности использованной экспериментальной техники и, при необходимости, ее воспроизведения. Результаты исследования изложены ясно, конкретно, по каждой группе экспериментальных данных делается адекватное заключение.

Глава «Обсуждение» логически суммирует полученные данные и проводит сопоставление их с имеющимся мировым экспериментальным опытом в данной области, подготавливая читателя к изложению Рекомендаций и Заключения. Текст этих разделов включает не только позитивные стороны полученной клеточной культуры, но и, что немаловажно, ограничения данного исследования.

Результаты диссертационной работы А.Л. Примак опубликованы в 9 отечественных и зарубежных журналах из списка Scopus, Web of Science, RSCI, а также доложены на российских и зарубежных конференциях и школах. На основании полученных

результатов подана заявка на патент на изобретение РФ № 2026107924 от 23.03.2026.

Кроме того, результаты исследования были доложены на российских и зарубежных конференциях и школах и опубликованы в рецензируемых научных журналах из списка Scopus, Web of Science, RSCI. На основании полученных результатов подана заявка на патент на изобретение РФ № 2026107924 от 23.03.2026.

Научная работа автора диссертации была отмечена Стипендией Президента Российской Федерации для аспирантов и адъюнктов, обучающихся по очной форме обучения в российских организациях, осуществляющих образовательную деятельность, и проводящих научные исследования в рамках реализации приоритетов научно-технологического развития Российской Федерации, определенных в Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации (2024 г.), Стипендией Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова молодым сотрудникам, аспирантам и студентам, добившимся значительных результатов в педагогической и научно-исследовательской деятельности (2022 г., 2023 г., 2025 г.), за статьи, опубликованные соискателем (в соавторстве) по теме диссертации, был присвоен статус «победитель» в Конкурсе работ, способствующих решению задач Программы развития Московского университета в номинации «Выдающиеся научные статьи» (2023-2025 гг.).

### **Замечания к диссертационной работе**

1. Рисунок 14 (дифференцировочный потенциал МСК): имело смысл привести данные по окраске исходных,

недифференцированных клеточных культур для демонстрации динамики дифференцировки.

2. Стр. 114-115, рис. 27-28 - желательно сделать дополнительное пояснение: что означают пунктирные линии на имиджах?
3. Стр 116, рис. 29: имеется ли более удачный вариант имиджа вестерна?
4. Вопрос к задаче 3: чем обусловлен выбор анализируемых факторов, в особенности компонентов SASP? Проводился ли автором анализ литературных данных о составе SASP в МСК?
5. Данные рис. 10 и далее: С чем связано различие в номерах анализируемых пассажей для пМСК, МСКtert-1, МСКtert-2, МСКtert-3 и ASC52telo? Были ли здесь какие-либо методические трудности?
6. Стр. 22: не совсем точно называть фракцию везикул «нерастворимой фракцией», - это просто «фракция везикул» или «везикулярная фракция».
7. Стр. 88: название раздела 2.14.3. «Влияние секрета МСК TERT на экспрессию ротоонкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста культивируемых в присутствии секрета клеток» не совсем удачно.
8. Стр. 102: Кальциевый зонд fluo-8 способен проникать в клетки только в форме fluo-8DA (диацетилированная гидрофобная форма. В клетке он деацетилируется и становится гидрофильным).
9. Стр. 127 и далее: автор использует в работе термин «бета-галактозидаза», что не совсем корректно, поскольку речь идет конкретной форме этого фермента - бета-Галактозидазе, Ассоциированной с Сенесценцией (SA- $\beta$ -Gal). Именно ее следует упоминать в связи с сенесценцией клеток.

10. В работе отсутствует список сокращений с их расшифровкой.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Примак Александра Леонидовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник лаборатории ангиогенеза Института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Меньшиков Михаил Юрьевич

11.06.2026

Контактные данные:

тел.: 7(495)4146797, e-mail [myushkin@mail.ru](mailto:myushkin@mail.ru)

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.00.04 – Биохимия

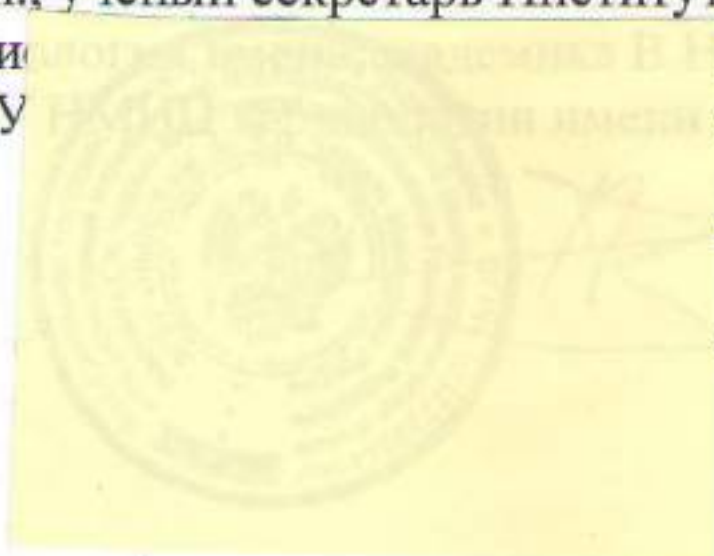
Адрес места работы:

121552, г. Москва, ул. Академика Чазова, д. 15А,  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр  
кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации, институт  
экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова  
Тел.: 7(916)4846159, e-mail: [nyushin@mail.ru](mailto:nyushin@mail.ru)

Подпись сотрудника ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И.  
Чазова» д.б.н. М.Ю. Меньшикова

удостоверяю:

Д.м.н., ученый секретарь Института экспериментальной  
кардиологии имени академика В.Н. Смирнова  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр  
кардиологии имени академика Е.И. Чазова»



О.С.Плеханова