

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Юровой Кристины Алексеевны «Кооперация стромальных стволовых и иммунных клеток на *in vitro* модели регенерации костной ткани», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология

### Актуальность темы диссертационного исследования

Диссертационная работа Юровой Кристины Алексеевны посвящена изучению особенностей межклеточной кооперации стромальных стволовых и иммунных клеток. Актуальность темы исследования определяется бурным развитием остеоиммунологии – новой междисциплинарной области исследований. Известно, что костная ткань выполняет не только структурную и поддерживающую функции, но также выполняет метаболическую роль в организме и участвует в механизмах кроветворения. Эффективная реализация описанных функций осуществляется благодаря непрерывающемуся процессу костного ремоделирования. Важное значение в костном ремоделировании имеют кооперативные взаимодействия клеток иммунной системы и стромальных стволовых клеток человека, выявление особенностей которых позволяет экстраполировать обнаруженные взаимосвязи на особенности физиологической регенерации костной ткани. Межклеточная кооперация представляет собой тонкий однонаправленный процесс, формирующий эффективный клеточный ответ на то или иное воздействие. Следует отметить важную роль медиаторов, продуцируемых разными субпопуляциями клеток: изменение направленного сигналинга на клеточные рецепторы определяет судьбу клеток и особенности жизнедеятельности, в том числе, активацию, дифференцировку, апоптоз. Стромальные стволовые клетки играют важную роль в тканевой регенерации и могут регулировать как врожденные, так и приобретенные механизмы иммунного ответа. В то же время, иммунные клетки также способны быстро реагировать на изменяющиеся условия окружающей среды, формируя уникальное микроокружение посредством продукции специфических медиаторов. Провоспалительные и противовоспалительные цитокины действуют разнонаправленно, изменяя условия микросреды и клеточные реакции. Особенности и направленность

каскадов реакций стромальных стволовых и иммунных клеток зависит от микроокружения, физических и химических стимулов. Клетки костной ткани также зависимы от механических стимулов, поэтому особенности регенерации костной ткани важно исследовать в условиях трехмерного культивирования. Очевидное наличие большого числа особенностей регенерации костной ткани, обусловленной межклеточными взаимодействиями, затрудняет исследование этого процесса в условиях *in vitro*. Работа, представленная Юровой К.А., включает все необходимые аспекты для актуального и современного исследования особенностей кооперации стромальных стволовых и иммунных клеток при изучении модели регенерации костной ткани *in vitro*. Таким образом, изучение клеточных и молекулярных механизмов кооперации стромальных стволовых и иммунных клеток на *in vitro* модели регенерации костной ткани несомненно является актуальной темой исследований.

#### **Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации**

Основные научные положения и выводы диссертации отражают решение поставленных задач и базируются на результатах собственных исследований. Интерпретация полученных данных проведена в контексте современных представлений об особенностях кооперационных взаимодействий стромальных стволовых и иммунных клеток. Автор использовал материалы 406 источников современной литературы, в том числе 384 – иностранных, для обоснования цели исследования, основных методологических подходов, а также при обсуждении результатов собственных исследований. Таким образом, научные положения, выводы, сформулированные в диссертации, в полной мере обоснованы.

#### **Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций**

Диссертация Юровой К.А. выполнена на высоком научном и методическом уровне. Представленные в диссертационной работе данные не вызывают сомнения. Методы исследования соответствуют поставленным задачам, современны, высокотехнологичны и основаны на глубоком анализе современной научной литературы. Полученные результаты подвергнуты адекватной статистической

обработке с использованием статистических методов в зависимости от характеристик сравниваемых выборок. Достоверность представленных результатов и сформулированных на их основе выводов не вызывают сомнения.

### Научная новизна полученных результатов

Приоритетными являются данные о роли стромальных стволовых клеток в процессах созревания и дифференцировки иммунокомпетентных клеток, за счет увеличения количества  $[CD3CD45R0]^+$  и  $[CD3CD45RACD45R0]^+$  клеток.

Проведенные исследования убедительно продемонстрировали роль трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием как неспецифического физиологического раздражителя, присутствие которого в среде культивирования способствует достоверному повышению уровня про- и противовоспалительных медиаторов, что и является важным фактором, который инициирует увеличение уровня экспрессии мРНК генов созревания и дифференцировки иммунных клеток.

Автор впервые установил, что по истечению 14 суток культивирования в монокультуре стромальных стволовых клеток в присутствии трехмерного матрикса отмечается рост уровня экспрессии остеодифференцировочных генов, в частности - *RUNX2* и *ALPL*. Более того, отмечается, что увеличение уровня относительной экспрессии исследуемых генов имеет положительную корреляционную взаимосвязь с увеличением числа  $[CD45,34,14,20]^+$  клеток. Отмечается, что описанные изменения реализуются на фоне повышения уровня хемокина RANTES, который контролирует функциональную активность гемопоэтических клеток-предшественниц. Новыми являются результаты исследования показателей уровня гемопоэтических факторов роста (LIF, SCF, G-CSF и Eotaxin), которые потенцируют увеличение количества  $[CD45,34,14,20]^+$  клеток. Отмечается, что описанные изменения были обнаружены как в монокультуре стромальных стволовых клеток, так и в смешанной модели культивирования в присутствии трехмерного матрикса. Впервые показана роль трехмерного матрикса с кальцийфосфатным покрытием как индуктора дифференцировки стромальных стволовых клеток, что подтверждается в работе уменьшением количества клеток с фенотипом CD73 и CD90. Также отмечается, что снижение числа  $[CD73, CD90]^+$  клеток ассоциировано с увеличением экспрессии генов остеодифференцировки -

*ALPL* и *SMURF*. Достоинство представленного исследования заключается в том, что в дизайне исследования автор включил несколько временных точек для корректного описания процессов, происходящих в различных экспериментальных группах при культивирования *in vitro*. Впервые показано, что взаимодействие иммунных и стромальных стволовых клеток в присутствии трехмерного матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань, потенцирует рост уровня остеокальцина в среде культивирования, а также способствует увеличению количества клеток с морфологией кроветворных и площади островков минерализации на пластике вблизи трехмерных образцов, что убедительно доказывает дифференцировку стромальных стволовых клеток в остеогенном направлении. Таким образом, проведенное исследование убедительно демонстрирует роль ауто- и паракринных механизмов активной гуморальной и межклеточной кооперации стромальных стволовых и иммунных клеток в регуляции межклеточных взаимодействий, необходимых для формирования минерализованного костного матрикса, как важного элемента гемопозиндуцирующего микроокружения. Вышесказанное свидетельствует о высокой степени новизны результатов и выводов диссертационной работы.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Диссертация К.А. Юровой относится к работам, имеющим фундаментальный и практический характер. Полученные данные раскрывают новые механизмы межмолекулярных взаимодействий в физиологических механизмах регенерации костной ткани и имеют высокую теоретическую ценность для персонализированного моделирования процессов костной регенерации, а также для создания нового класса материалов медицинского назначения. Показана роль иммунокомпетентных клеток в формировании гемопозитического окружения, необходимого для эффективной дифференцировки стромальных стволовых клеток в остеогенном направлении. Представлены сведения, касающиеся участия остеокальцина, присутствующего в супернатантах клеточных культур, в увеличении количественного содержания клеток с морфологией кроветворных, идентифицируемых на пластике вблизи трехмерных матриксов. Практическая значимость работы Кристины Алексеевны обусловлена потенциальной

возможностью развития новой стратегии тестирования новых материалов и персонализированного выбора имплантатов для индивидуальных решений в сфере технологий биоинженерии костной ткани.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертация написана в традиционном стиле и включает разделы: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материал и методы исследования», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение полученных результатов», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Материал диссертации изложен на 250 страницах машинописного текста. Библиографический указатель одержит 406 источников: 22 отечественных и 384 иностранных. Работа иллюстрирована 20 рисунками и 20 таблицами.

Во введении обоснована актуальность избранной темы, степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, научна новизна исследования, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы диссертационного исследования, а также степень достоверности результатов, их апробация и сведения о публикации основных материалов.

**Обзор литературы** включает современные данные, касающиеся иммунной регуляции стволовых клеток, а также особенностей взаимодействия костной и иммунной систем, описан процесс физиологического ремоделирования кости и роль экстрацеллюлярного матрикса в жизнедеятельности клеток. Отдельная подглава также посвящена гемопоэтическим стволовым клеткам. Литературный обзор позволяет получить представление о состоянии проблемы, убеждает читателя в необходимости проведения данного исследования.

Глава **«Материалы и методы»** содержит все необходимые сведения о материалах и методах, соответствующих поставленным задачам. Представлены сроки, объем проведенных исследований, также сведения о документах, утверждающих проведение работ, сформулированы критерии включения и исключения условно здоровых доноров из исследования. Дизайн диссертационного исследования отражает характеристики экспериментального и аналитического

этапов исследования. Подробно описаны примененные высокотехнологичные методы исследования. Используемые методы и подходы современны, адекватны и позволяют достичь решения поставленных задач.

**В 3 главе** представлены данные, касающиеся количественного определения относительного содержания жизнеспособных, апоптотических и мертвых форм клеток. Проведен анализ продукции медиаторов (хемокинов, про- и противовоспалительных цитокинов, факторов роста) в разных экспериментальных культурах клеток в условиях *in vitro* в присутствии трёхмерных матриксов с кальций-фосфатным покрытием, а также дана количественная оценка молекул дифференцировки на клеточной поверхности. Интерес представляют результаты изучения уровня относительной экспрессии мРНК генов дифференцировки и анализ суммарной площади очагов минерализации в разных экспериментальных культурах. Заслуживает внимания изучение уровня остеокальцина в супернатантах разных экспериментальных культур клеток.

**Глава 4** представляет собой анализ данных, характеризующих особенности клеточных и молекулярных механизмов кооперации стромальных стволовых и иммунных клеток на *in vitro* модели регенерации костной ткани. Обсуждение результатов работы сопровождается разработанными автором схемами, которые отражают особенности дистантного взаимодействия монокультур стромальных стволовых и иммунных клеток с трёхмерным матриксом с кальций-фосфатным покрытием, а также специфические механизмы кооперативного взаимодействия смешанной культуры стромальных стволовых и иммунных клеток в присутствии 3D-матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань. Представлена заключительная схема, обобщающая клеточные и молекулярные аспекты, определяющие формирование эффективной кооперации стромальных стволовых и иммунных клеток крови человека на *in vitro* модели регенерации костной ткани.

В главе «**Обсуждение**» проведено обоснованное сопоставление полученных результатов с данными литературы.

Раздел «**Заключение**» посвящен подведению краткого итога проделанной работы.

Девять выводов структурированы, аргументированы и полностью соответствуют полученным результатам диссертационной работы.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации. По теме диссертации опубликовано 45 печатных работ, из них 19 статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ, а также 26 статей и тезисов в материалах конференций, съездов и симпозиумов.

Результаты и выводы диссертации могут быть внедрены в учебный процесс медицинских и биологических факультетов в разделе «клеточная биология» и рекомендованы как базовые технологии в разработке новых подходов оценки межклеточных взаимоотношений в лабораториях клеточных технологий.

В целом диссертация производит благоприятное впечатление, она оригинальна, высокотехнологична, конкретна, обладает внутренним единством, написана хорошим литературным языком. Работа достаточно хорошо иллюстрирована. Встречаются единичные опечатки и стилистические погрешности, но они не снижают значимости диссертации. Существенных замечаний, которые могли бы повлиять на научную ценность представленной работы, нет. Тем не менее, при ознакомлении с диссертацией возникли следующие вопросы уточняющего и дискуссионного характера:

1. Почему в модели используются стромальные клетки жировой ткани, которые функционально отличаются от клеток костного мозга?
2. Культивирование представленных в работе стромальных клеток и лимфоцитов в монокультуре проводится в разных ростовых средах. Чем обусловлен выбор общей среды культивирования  $\alpha$ -MEM?
3. В работе представлено одно количественное соотношение двух популяций клеток. Исследовалось ли другое соотношение и чем обусловлен данный выбор?
4. Чем руководствовался автор при выборе спектра исследуемых медиаторов: цитокинов, хемокинов и факторов роста?
5. Количественное исследование факторов (цитокинов, хемокинов, факторов роста) проводили только на 14-е сутки; почему не были исследованы данные анализы на 7-ые и 21-е сутки культивирования?
6. Какую нагрузку в масштабах организма, а также в контексте регенерации костной ткани *in vivo* несут клетки с фенотипом: CD3+CD45RA+, CD3+CD45R0+.

CD3+CD45RA+CD45R0+. Почему автор во всех блоках своего исследования акцентирует на них свое внимание?

7. Какую роль могут играть эндотелиальные клетки и медиаторы во взаимоотношениях стромальных клеток с иммунными и регенерации костной ткани?

Таким образом, диссертационная работа К.А. Юровой выполнена на достаточном объеме материала с применением современных и высокотехнологичных методов исследования.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Юровой Кристины Алексеевны «Кооперация стромальных стволовых и иммунных клеток на *in vitro* модели регенерации костной ткани», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология, является научно-квалификационной работой, в которой на основе выполненных автором исследований и полученных результатов сформулированы теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как принципиально новое решение крупной научной проблемы, раскрывающей клеточные и молекулярные механизмы эффективной кооперации стромальных стволовых и иммунных клеток в модели регенерации костной ткани, что имеет важное значение для клеточной биологии, регенеративной биомедицины и биоинженерии.


Диссертация Юровой К.А. соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013, с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 № 335, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.



**Официальный оппонент:**


Заведующий лабораторией клеточных технологий  
научно-исследовательского института клинической  
и экспериментальной лимфологии – филиала  
Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения «Федеральный исследовательский  
центр Институт цитологии и генетики Сибирского  
отделения Российской  
академии наук»  
доктор медицинских наук



 – Повещенко Ольга Владимировна



Ученый секретарь  
НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН  
кандидат биологических наук

 Соловьева Анастасия Олеговна

Личную подпись  заверяю
Начальник отдела кадров:  Н.С. Борисова
« 6 » III 2024 г.

На обработку персональных данных согласна

**Данные об авторе отзыва:** Повещенко Ольга Владимировна - доктор медицинских наук, заведующий лабораторией клеточных технологий научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»; 630060, Новосибирская область, г. Новосибирск, ул. Тимакова, д.2; тел.: +7-913-378-4712; [poveschenkoov@yandex.ru](mailto:poveschenkoov@yandex.ru)

об официальном оппоненте докторе медицинских наук Повещенко Ольге Владимировне по диссертации Юровой Кристины Алексеевны на тему «**Кооперация стромальных стволовых и иммунных клеток на in vitro модели регенерации костной ткани**», представленной на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология в диссертационном совете Д 21.2.068.03 при федеральном государственном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» министерства здравоохранения российской федерации (634050, г. Томск, Московский тракт, 2, тел./факс (+7 (382) 290-11-01 доб. 1568, E-mail: dissovvet@ssmu.ru)

Фамилия, имя, отчество	Год рождения, гражданство	Место основной работы (с указанием организации, её принадлежности, города); должность	Учёная степень (с указанием шифра специальности, по которой защищена диссертация)	Учёное звание (по специальности, кафедре)	Шифр специальности и отрасли науки в совете	Основные работы
Повещенко Ольга Владимировна	25.05.1958, РФ	Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»  ДОЛЖНОСТЬ. Заведующая лабораторией  Адрес: 630060,	Доктор медицинских наук (1.5.22. Клеточная биология)	нет	1.5.22. Клеточная биология	<p>1. Суровцева М.А., Ким И.И., Бондаренко Н.А., Остапец С.В., Дровосеков М.Н., Косарева О.С., Повещенко О.В. Буккальные мезенхимные стромальные клетки - источник остеинтеграции титановых имплантов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2023. Т. 176. № 11. С. 641-646.</p> <p>2. Surovtseva M.A., Poveshchenko O.V., Kim I.I., Bondarenko N.A., Cherepeleva E.V., Lykov A.P., Zhuravleva I.Yu., Kuzmin O.S., Kozhukhov A.S., Shcheglov D.V., Kolodin A.N., Pichugin V.F. Titanium oxide- and oxynitride-coated nitinol: effects of surface structure and composition on interactions with endothelial cells // Applied Surface Science. 2022. Т. 578. С. 152059.</p> <p>3. Ким И.И., Суровцева М.А., Повещенко О.В., Бондаренко Н.А., Чепелева Е.В., Журавлева И.Ю. Биосовместимость покрытий из оксинитридов титана, полученных с помощью реактивного магнетронного распыления // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2022. Т. 173. № 6. С. 770-774.</p> <p>4. Лыков А.П., Опоку М., Рачковская Л.Н.,</p>

		Новосибирская область, г. Новосибирск, ул. Тимакова, д.2			<p>Суровцева М.А., Бондаренко Н.А., Ким И.И., Рачковский Э.Э., Володин А.М., Повещенко О.В. Синтез неселективных сорбентов, модифицированных углеродными наноматериалами, и их гемосовместимость // Российские нанотехнологии. 2022. Т. 17. № 2. С. 252-260.</p> <p>5. Ким И.И., Суровцева М.А., Бондаренко Н.А., Лыков А.П., Повещенко О.В., Чепелева Е.В., Журавлева И.Ю., Алишевская А.А. Интегральный показатель в оценке биосовместимости покрытий из оксинитридов титана, полученных с помощью реактивного магнетронного распыления // Гены и Клетки. 2022. Т. 17. № 3. С. 105-106.</p> <p>6. Лыков А.П., Суровцева М.А., Бондаренко Н.А., Ким И.И., Гаврилова Ю.С., Бгатова Н.П., Повещенко О.В. Влияние эритропоэтина на функциональные свойства мезенхимных стволовых клеток in vitro // Гены и Клетки. 2022. Т. 17. № 3. С. 139.</p> <p>7. Суровцева М.А., Повещенко О.В., Краснер К.Ю., Ким И.И., Лыков А.П., Бондаренко Н.А., Шульмина Л.А., Трунов А.Н., Черных В.В. Морфофункциональные свойства стромальных клеток роговицы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021. Т. 172. № 7. С. 115-119.</p>
--	--	--	--	--	---

Официальный оппонент  
 заведующая лабораторией клеточных технологий  
 НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН,  
 доктор медицинских наук

Повещенко Ольга Владимировна




Личную подпись  
 Повещенко О.В. заверяю  
 Начальник отдела кадров:  
 Н.С. Борисова  
 26.12.2023г.

« 26 » декабря 2023г.