

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

Исследование межклеточных и межмолекулярных кооперативных взаимодействий в настоящее время набирает актуальность в связи с появлением новых высокоточных и информативных методов исследования. Одним из перспективных направлений в контексте данной тематики исследований является физиологическая регенерация костной ткани. Физиологическое ремоделирование костной ткани обеспечивает высокий уровень адаптации костной системы и скелета к постоянно меняющимся условиям. В настоящее время известно, что клетки иммунной системы являются неотъемлемыми участниками процесса костного ремоделирования. Однако степень участия и их ключевая роль в этом процессе до конца не изучены. В связи с этим, исследования, посвященные изучению кооперативных взаимодействий стромальных стволовых и иммунных клеток в модели регенерации костной ткани, являются актуальными и своевременными. Физиологическая регенерация костной ткани является сложным многоступенчатым процессом и сопровождается изменением и обновлением костной ткани всего организма. Безусловно, анализ межклеточных взаимодействий стромальных стволовых и иммунных клеток будет способствовать исследованию механизмов регенерации костной ткани. Важную роль в модуляции процессов, описывающих регенерацию костной ткани, играет пространственное взаимодействие клеток в условиях культивирования *in vitro*, так как стромальные стволовые клетки очень чувствительны к физическим и химическим факторам воздействия. Таким образом, условия культивирования, в том числе, присутствие иммунокомпетентных клеток, создают специфическое микроокружение,

которое влияет на клеточную судьбу. Изменение условий культивирования кардинально влияет на особенности жизнедеятельности клеток, именно поэтому так важно создать условия культивирования, приближенные к реальным. Важно отметить, что одним из главных компонентов физиологического ремоделирования кости, который регулируют остеобласты, являются кроветворные клетки-предшественники. Понимание каскадов реакций, обеспечивающих поддержание гомеостатического баланса между процессами резорбции и образования костной ткани важно для биоинженерии и реконструктивной остеологии. Таким образом, диссертационная работа Юровой К.А. имеет фундаментальный характер и направлена на изучение особенностей клеточно-молекулярных взаимосвязей стромальных стволовых и иммунокомпетентных клеток, определяющих их эффективное кооперативное взаимодействие в контексте регенерации костной ткани.

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

Положения, выносимые на защиту, выводы диссертации соответствуют поставленным задачам и основаны на результатах собственных исследований. Проведенный анализ полученных результатов соответствует последним данным о механизмах регенерации костной ткани. Формулировка выводов и положений, выносимых на защиту, корректна и логически выверена. Для доказательства цели исследования, основных методологических подходов, а также при обсуждении результатов собственных исследований автор использовал материалы 406 источников современной литературы, в том числе 384 - иностранных. Таким образом, научные положения, выводы, сформулированные в диссертации, в полной мере обоснованы.

Достоверность научных положений, выводов

Достоверность данных, представленных в диссертационной работе, не вызывает сомнений. Методы исследования, которые использовал соискатель, являются современными, высокоинформативными и позволяют решить поставленные задачи. Полученные результаты были проанализированы автором с применением адекватных статистических методов, в зависимости от характеристик сравниваемых выборок. Достоверность представленных результатов и выводов, сформулированных на их основе, не вызывает сомнений.

Научная новизна полученных результатов

Новыми в работе Юровой К.А. являются результаты, полученные при оценке морфофункциональных реакций монокультур иммунных и стромальных стволовых клеток в условиях их дистантного *in vitro* сокультивирования с трехмерным матриксом с кальций-фосфатным покрытием. Автором показано, что трехмерный матрикс является физиологическим раздражителем, который потенцирует увеличение уровня медиаторов (цитокинов, хемокинов, факторов роста) в среде культивирования, что, в свою очередь, инициирует повышение экспрессии мРНК дифференцировочных генов и приводит к изменению фенотипического профиля исследуемых популяций клеток. Юровой К.А. впервые выявлено, что в смешанной модели культивирования, в присутствии трехмерного матрикса, у иммунокомпетентных клеток отмечается сниженный активационный потенциал, так как микроокружение потенцирует процессы их созревания и клеточной дифференцировки. В популяции стромальных стволовых клеток в смешанной 3D-культуре также отмечаются дифференцировочные процессы в остеогенном направлении. Юровой К.А. впервые было показано, что выявленные и описанные ею изменения клеточного гомеостаза стромальных стволовых и иммунных клеток обусловлены специфическим микроокружением, в том числе, изменением уровня как про-, так и противовоспалительных цитокинов в культуральной

среде экспериментальных моделей. Научная ценность представленного Юровой К.А. исследования заключается в том, что впервые был проведен анализ популяции [CD45,34,14,20]⁺ клеток в смешанной модели культивирования. Было выявлено, что изменение количества [CD45,34,14,20]⁺ клеток происходит за счет изменения уровня гемопоэтинов (SCF, G-CSF, LIF), а также хемокина RANTES и числа клеток с фенотипом - CD90. Приоритет имеют данные о взаимосвязи содержания клеток с морфологией гемопоэтических с повышением уровня остеокальцина в среде культивирования и ростом площади очагов минерализации в 21-дневных смешанных культурах иммуннокомпетентных и стромальных стволовых клеток, в условиях сокультивирования с трехмерным матриксом с кальций-фосфатным покрытием.

Впервые показано, что кооперация стромальных стволовых и иммунных клеток в присутствии трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием, потенцирует повышение уровня остеокальцина в среде культивирования. Продемонстрированное Юровой К.А. увеличение числа клеток с морфологией кроветворных, с одновременным увлечением площади очагов минерализации - отражает процесс клеточной дифференцировки стромальных стволовых клеток в остеогенном направлении. Несомненно, высокую научную ценность представляют данные, свидетельствующие о важности межклеточной кооперации, создающей специфическое микроокружение, результатом чего является формирование минерализованного костного матрикса. На основании вышесказанного можно свидетельствовать о высокой степени новизны результатов и выводов диссертационного исследования.

Теоретическая и практическая значимость работы

Диссертация К.А. Юровой представляет собой исследование фундаментального и практического характера. В работе представлены данные о роли иммунных клеток в направленной дифференцировке в остеогенном направлении стромальных стволовых клеток. Показана

ключевая роль стромальных стволовых клеток в инициации процессов созревания и, напротив, ингибировании пролиферативного ответа иммунных клеток, в частности, Т-лимфоцитов. Полученные Юровой К.А. данные о клеточно-молекулярных особенностях взаимодействия стромальных стволовых и иммунных клеток в условиях смешанного культивирования, имеют высокую практическую значимость для клеточной биологии, биоинженерии и регенеративной медицины. Безусловно, результаты диссертационной работы могут стать базисом для новых методологических подходов клеточного культивирования с акцентом на контролируемую дифференцировку и наращивание отдельных субпопуляций клеток.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация Юровой К.А. построена по традиционному плану и включает разделы «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материал и методы исследования», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение полученных результатов», «Заключение», «Выводы», «Список использованной литературы». Диссертация изложена на 250 страницах машинописного текста. Библиографический указатель состоит из 406 источников: 22 отечественных и 384 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 20 рисунками и 20 таблицами.

Во введении обосновывается актуальность диссертационного исследования, сформулированы его цель и задачи, положения, выносимые на защиту, научная новизна, а также практическая и теоретическая значимость.

Обзор литературы представляет анализ современных данных, освещающих особенности взаимодействия костной и иммунной систем, в том числе, в контексте физиологического ремоделирования кости. Отдельные подглавы посвящены трехмерному культивированию и роли трехмерного матрикса в механизмах межклеточных кооперативных взаимодействий.

Глава **«Материал и методы исследований»** представляет информацию о месте проведения диссертационной работы, о документах, регламентирующих проведение работы. Дизайн научной работы представлен

в виде двух блоков, в которых отражены экспериментальный и аналитический этапы исследования. Представлены подробные описания экспериментальных и статистических методов исследования. Глава «Материалы и методы» полностью соответствует поставленным задачам.

Результаты собственных исследований описаны в **3 главе**. Так, в данной главе представлены результаты изучения клеточно-молекулярных аспектов исследования. Фундаментальный характер имеют результаты фенотипической оценки клеточных культур, экспрессии мРНК дифференцировочных генов, уровня исследуемых медиаторов (таких как цитокины, хемокины, факторы роста). Данные, полученные при морфометрическом исследовании, позволили соискателю провести анализ суммарной площади очагов минерализации в различных экспериментальных группах. Интересные данные были получены при изучении числа клеток с морфологией кроветворных в разных исследуемых группах.

Фундаментальным разделом, посвященным анализу полученных результатов, выступает **глава 4**, включающая данные об особенностях взаимодействия монокультур иммунных клеток или стромальных стволовых клеток с трехмерным матриксом, а также данные, касающиеся особенностей межклеточной кооперации смешанной культуры стромальных стволовых и иммунных клеток как в присутствии трехмерного матрикса, так и без него. В 4 главе представлены авторские схемы, описывающие межмолекулярные взаимосвязи в различных условиях культивирования. Завершает обсуждение полученных результатов заключительная схема, обобщающая закономерности и особенности, отражающие взаимосвязи стромальных стволовых и иммунных клеток в модели регенерации костной ткани *in vitro*.

Девять выводов отражают результаты проведенных исследований, четко сформулированы, логичны, аргументированы.

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями п. 25 Положения о присуждении ученых степеней, логично структурирован, полностью отражает содержание диссертации, все основные положения и

выводы. Работа соответствует паспорту научной специальности: 1.5.22. Клеточная биология.

По теме диссертации опубликовано 45 печатных работ, из них 19 статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ, и 26 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов. Таким образом, диссертационная работа К.А. Юровой выполнена на достаточном объеме материала с использованием современных методов исследования.

Принципиальных замечаний по научному содержанию диссертации и её оформлению нет.

В ходе изучения диссертационной работы возникли следующие вопросы уточняющего характера:

1. При описании трехмерного матрикса с кальцийфосфатным покрытием, Вы используете слово «неспецифический», однако в модели стромальных стволовых клеток показано, что его присутствие оказывает влияние на изменение экспрессии остеодифференцировочных генов. Как Вы можете объяснить этот факт влияния 3D-матрикса на культуру стромальных стволовых клеток?

2. Какими факторами, на Ваш взгляд, вызвано повышение уровня содержания хемокина RANTES в трехмерной монокультуре стромальных стволовых клеток?

3. Как, на Ваш взгляд, можно интерпретировать изменение уровня провоспалительных цитокинов в смешанной модели культивирования в условиях трехмерного культивирования по сравнению со смешанной 2D-моделью?

4. Вами было показано, что трехмерный матрикс с кальцийфосфатным покрытием, является неспецифическим активатором (без участия TCR) и оказывает влияние на функциональную активность иммунокомпетентных клеток в условиях дистантного взаимодействия. Каковы возможные механизмы активации Т-лимфоцитов без участия Т-

клеточного рецептора (TCR)? Каким образом в данном случае реализуется сигнальная трансдукция – передача активационного сигнала в ядро клетки?

5. Может ли иметь прогностическое значение при разработке и применении костных имплантов снижение числа Т-клеток, экспрессирующих маркеры ранней (CD25) и поздней (CD71) активации на фоне увеличения Т-клеток памяти с иммунофенотипом CD3+CD45R0+ в 3D модели культивирования, а также одновременное и более выраженное увеличение числа CD3+CD45R0+ Т-клеток и переходных двойных позитивных Т-лимфоцитов с иммунофенотипом CD3+CD45RA+CD45R0+, установленные Вами в смешанной экспериментальной модели культивирования, при добавлении трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация 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 законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований содержится решение актуальной научной проблемы, направленной на выявление клеточных и молекулярных аспектов, определяющих формирование эффективной кооперации стромальных стволовых и неприлипающих иммунных клеток крови человека на *in vitro* модели регенерации костной ткани, имеющей важное значение для развития соответствующей отрасли знаний - клеточной биологии. Диссертационная работа Юровой Кристины Алексеевны по актуальности, научной новизне, практической, теоретической значимости и достоверности полученных результатов, полноте изложения и обоснованности выводов соответствует требованиям пункта 9 Положения о присужден ученых степеней (Постановление Правительств Российской Федерации от 24

сентября 2013 года № 842), предъявляемых 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:

профессор кафедры природных соединений,
фармацевтической и медицинской химии
федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего
образования «Национальный исследовательский
Томский государственный университет»
Министерства образования и науки
Российской Федерации,

доктор медицинских наук

11.03.2024




Чурина Елена Георгиевна

На обработку персональных данных согласна

Данные об авторе отзыва: Чурина Елена Георгиевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры природных соединений, фармацевтической и медицинской химии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации; 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36; телефон (раб/моб) 8(382)2-423944/+79138060700, e-mail: lena1236@yandex.ru



Подпись удостоверяю
Ведущий документовед
Андрienko И.В.

 11.03.24

СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте докторе медицинских наук **Чуриной Елены Георгиевны** 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 бюджетном 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 ведомственной принадлежности, должность 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
Чурина Елена Георгиевна	1973, РФ	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации; профессор кафедры природных соединений, фармацевтической и медицинской химии –	Доктор медицинских наук, 3.3.3. 3.2.7.	нет		<ol style="list-style-type: none"> <i>Lytkina D., Heinrich L., Churina E., Kurzina I.</i> Biocompatible composite materials based on porous hydroxyapatite ceramics and copolymer of lactide and glycolide // <i>Materials.</i> – 2021. – Vol. 14(9). – P. 2168. <i>Волохова А.А., Солдатова Е.А., Чурина Е.Г., Ларуть О.А., Твердохлебов С.И.</i> Применение электролитов с растворенными биодеградируемыми полимерами для получения биоактивных кальций-фосфатных покрытий методом микродугового окисления // <i>Вестник Томского государственного университета. Химия.</i> – 2020. – № 19. – С. 21–36. <i>Sharovalova Y. G., Churina E. G., Kzhyshkowska J. G.</i> Effect of biodegradable scaffolds for targeted immunotherapy on differentiation of macrophages // <i>Proceedings of the house of Tomsk University: Proceedings of the International Symposium. The 22nd international charles heidelberg symposium on cancer research. Tomsk, 17-19 September 2018.</i> – P. 95–97. <i>Шляхтун А.С., Шаповалова Е., Чурина Е. Г.</i> Влияние свойств поверхности полимерного композиционного материала на

						<p>биодegradацию полимера в составе композита // Перспективы развития фундаментальных наук. – 2019. – С. 243–245.</p> <p>5. Чумакова С.П., Уразова О.И., Денисенко О.А., Винс М.В., Шипулин В.М., Пряхин А.С., Невская К.В., Гладковская М.В., Чурина Е.Г. Цитокины в механизмах регуляции моноцитопоза при ишемической болезни сердца // Гематология и трансфузиология. 2022. Т. 67. № 4. С. 511-524.</p> <p>6. Чурина Е.Г., Попова А.В., Уразова О.И., Патышева М.Р., Чумакова С.П., Колобовникова Ю.В., Казакова Е.О. Экспрессия молекул CD80 и HLA-DR на моноцитах крови у больных туберкулезом легких // Медицинская иммунология. 2021. Т. 23. № 5. С. 1183-1190.</p> <p>7. Кононова Т.Е., Уразова О.И., Чурина Е.Г. Роль адаптивных субпопуляций Т-лимфоцитов в патогенезе туберкулеза легких // Клиническая патофизиология. 2021. Т. 27. № 3. С. 63-68.</p>
--	--	--	--	--	--	--

Чурина

Официальный оппонент

Е.Г. Чурина 26.12.2023



ПОДПИСЬ УДОСТОВЕРЯЮ
ВЕДУЩИЙ ДАКУМЕНТОВЕД
АБДРЕНКО И.В.

И.В. Адренко