

ОТЗЫВ

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

Кость является метаболически активной тканью, постоянно обновляющейся у здоровых индивидуумов при участии клеток иммунной системы. Ремоделирование скелета человека – процесс, с помощью которого кости изменяют форму или размер в ответ на физиологические воздействия или механические силы, с которыми сталкивается скелет в течение жизни. Ремоделирование кости помогает сохранять ее прочность и минеральный гомеостаз. Фундаментальные исследования последних лет продемонстрировали сложные взаимодействия между иммунной и скелетной/костной системами. Иммунные клетки (ИК) и секретируемые ими цитокины способствуют регуляции костного гомеостаза, а костные клетки, включая остеобласты, остеокласты, остеоциты и стромальные стволовые клетки (ССК), также влияют на клеточные функции иммунных клеток. Эти механизмы перекрестных взаимодействий между костью и иммунной системой сформировали новую область исследований под названием остеоиммунология. Стволовые клетки и клетки-предшественники играют особую роль в поддержке роста и восстановления костей в зависимости от стадии костного ремоделирования. Показано, что иммунные клетки присутствуют в очаге регенерации на протяжении всего процесса костного ремоделирования. Тогда как остеобласты постоянно образуют новую кость, обеспечивая структурную платформу для поддержания гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге. В тоже время, создание искусственных 3D конструкций, которые по своим свойствам приближены к природному ЭЦМ, чрезвычайно затруднено и ограничено. Резюмируя вышесказанное, актуальность тематики и научная новизна диссертационного исследования Юровой К.А., направленного на выявление роли иммунного микроокружения в регенерации костной ткани, с одной стороны, и основных участников регенерации костной ткани - стромальных стволовых клеток, с другой, с использованием трехмерных искусственных матриц с кальций-фосфатным покрытием, имитирующих регенерирующую костную ткань, не вызывает сомнений, поскольку соискателем получены новые фундаментальные знания в области физиологии регенерации и ремоделирования костной ткани. В целом, в работе Юровой К.А., предпринята попытка изучения регенерации костной ткани в условиях созданной искусственной ниши костного мозга (трехмерных матриц с кальций-фосфатным покрытием) при отдельном и совместном культивировании стромальных стволовых и иммунных клеток.

В своей работе Юрова К.А. впервые выявила, что трехмерный матрикс с КФ покрытием при сокультивировании с монокультурами ИК и ССК, является

физиологическим раздражителем не антигенной природы. Приоритетными являются данные, свидетельствующие, что сокультивирование ИК и ССК в условиях 3D-модели (в течение 14 суток) способствует снижению числа CD3⁺ клеток, несущих на своей поверхности маркеры активации, а также наивных Т-клеток, при росте количества клеток иммунной памяти. Юровой К.А. убедительно продемонстрировано, что дифференцировка ССК в остеогенном направлении, регистрируемая в смешанных культурах, наряду с увеличением экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (*ALPL* и *SMURF*), характеризуется ростом числа клеток с фенотипом гемопоэтических [CD45,34,14,20]⁺, повышением концентрации в супернатантах клеточных культур гемопоэтических факторов роста (G-CSF, SCF, LIF, Eotaxin), про- (IFN γ , TNF α , IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10 и IL-13) факторов, хемокина RANTES. Соискателем показано, что взаимосвязь содержания клеток с морфологией гемопоэтических с повышением уровня остеокальцина в среде культивирования и ростом площади очагов минерализации в 21-дневных смешанных культурах ИК и ССК, в условиях непрямого контакта с трехмерным матриксом с КФ покрытием, отражает дифференцировку ССК в остеогенном направлении.

Принципиальных замечаний по написанию автореферата нет.

Результаты проведенного исследования были широко обсуждены научной и медицинской общественностью на региональных, всероссийских и международных съездах и научно-практических конференциях. По теме диссертации опубликовано 45 печатных работ, из них 19 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Личный вклад автора не вызывает сомнений. Следует отметить, что работа выполнялась при поддержке грантов государственных фондов, что еще раз подчеркивает актуальность выбранной темы исследования. Результаты диссертационного исследования Юровой К.А. используются в учебном процессе образовательного научного кластера «Институт медицины и наук о жизни (ОНК МЕДБИО)» БФУ им. И. Канта г. Калининград, а также в научно-исследовательской работе лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии ИЭГМ УрО РАН г. Пермь.

Положения, выносимые на защиту, и выводы диссертации, сделанные автором, являются логическим завершением выполненного исследования, убедительны, корректны, в полной мере раскрывают научную новизну и практическую значимость работы. В автореферате диссертационной работы Кристины Алексеевны Юровой на тему «Кооперация стромальных стволовых и иммунных клеток на *in vitro* модели регенерации костной ткани», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология, изложены теоретические положения, совокупность которых

можно квалифицировать как крупное научное достижение, вносящее вклад в развитие фундаментальных знаний о физиологии регенерации и ремоделирования костной ткани.

Заключение

Анализ автореферата показал, что диссертационная работа К.А. Юровой «Кооперация стромальных стволовых и иммунных клеток на *in vitro* модели регенерации костной ткани» представляет собой самостоятельное законченное научное исследование, выполненное по актуальной проблеме современной клеточной биологии, и полностью соответствует требованиям ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук в п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 11.09.2021 г. №1539), а ее автор – Юрова К.А. заслуживает присуждения искомой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Согласен на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных.

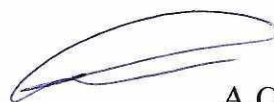
Научный руководитель

ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов»

ФМБА России

доктор медицинских наук, профессор

член-корреспондент РАН



А.С. Симбирцев

19.01.2024

Данные об авторе отзыва: Симбирцев Андрей Семенович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель Федерального государственного унитарного предприятия «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых препаратов» Федерального медико-биологического агентства, 197110 Россия, Санкт-Петербург, Пудожская ул., д. 7, тел.: 8(812)2351225, e-mail: a.s.simbirtsev@hpb.spb.ru

Подпись руки Симбирцева А.С.
подтверждено:

НАЧАЛЬНИК ОТДЕЛА КАДРОВ
И ДЕЛОПРОИЗВОДСТВА

Г.В. ГАЗУКИНА

19.01.2024



ОТЗЫВ

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

Костная ткань – полифункциональная, композитная и многокомпонентная система. Сложные взаимодействия между неорганическим минеральным матриксом и гетерогенными клеточными элементами позволяют реализовывать как функции механической поддержки, так и участвовать в активных метаболических процессах таких как гемо- и иммунопоэз. С другой стороны, процесс регенерации костной ткани зависит не только от различных типов клеток костной ткани, но и от интеграции и кооперации субпопуляций клеток мезенхимного происхождения, иммунокомпетентных клеток и их предшественников. Современные концепции физиологического ремоделирования и регенерации костной ткани являются неполными. Неизвестны многие механизмы взаимодействия гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) с костной тканью и их роль в ремоделировании и регенерации кости. В тоже время понятно, что ниши костного мозга должны иметь ключевое значение в этих процессах, так как включают клеточное микроокружение и внеклеточные компоненты, регулирующие активность ГСК, которые в свою очередь направляют дифференцировку стромальных стволовых клеток (ССК). Таким образом актуальность работы, представленной в автореферате Юровой К.А., не вызывает сомнений и характеризует работу диссертанта как своевременное, перспективное и востребованное исследование.

Юровой К.А. впервые была продемонстрирована роль трехмерного матрикса с КФ покрытием в качестве физиологического раздражителя для монокультур иммунокомпетентных (ИК) и ССК, стимулирующего продукцию про- и противовоспалительных, а также гемопоэтических факторов и потенцирующего экспрессию генов дифференцировки и созревания иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток. Установлено, что совместное культивирование ИК и ССК в присутствии трехмерного матрикса приводит к снижению доли иммунокомпетентных клеток (CD3⁺), экспрессирующих маркеры ранней (CD25) и

поздней (CD71) активации, при увеличении доли клеток, несущих молекулы созревания, дифференцировки (CD45R0⁺) и апоптоза (CD95⁺). Таким образом демонстрируется факт дифференцировки наивных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD45RA⁺) в Т-клетки иммунной памяти (CD3⁺CD45R0⁺), а также возможность образования переходных, дубльпозитивных форм клеток (CD3⁺CD45RA⁺CD45R0⁺) на 14 сутки. Соискателем впервые выявлено, что в 14-дневной монокультуре ССК, как и в смешанной 3D-модели культивирования доля [CD45,34,14,20]⁺ клеток - возрастает, чему способствует секреция клетками гемопоэтических факторов роста (LIF, SCF, G-CSF и Eotaxin). Этот эффект более выражен в смешанной 3D-модели. Приоритетными являются данные о том, что эффективная дифференцировка ССК в остеогенном направлении регистрируется в 3D-модели дистантного сокультивирования (14-дневное) в смешанном формате, что подтверждается достоверным снижением доля [CD73, CD90]⁺ клеток, негативно коррелирующим с ростом экспрессии генов остеодифференцировки - ALPL и SMURF.

Представленные Кристиной Алексеевной данные раскрывают особенности гуморальной и клеточной регуляции процессов физиологической регенерации костной ткани на межфазной границе между неорганическим костным матриксом и стромальными стволовыми и иммунокомпетентными клетками. Считаю, что эти данные могут послужить основой для формирования новых подходов в решении задач клеточной биологии, тканевой биоинженерии и регенеративной биомедицины.

Стоит отметить детально проработанный дизайн исследования, подробно отражающий ключевые этапы экспериментальной работы. В рамках выполнения работы использованы современные высокотехнологичные и высокоинформативные методы исследования, что позволило получить данные соответствующие мировому уровню. По теме диссертации опубликовано 45 научных работ, в том числе 19 статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ, а также опубликовано 26 статей и тезисов в материалах конференций, съездов, симпозиумов. Основные положения диссертации достаточно полно представлены автором в опубликованных работах. Личный вклад автора не вызывает сомнений.

Принципиальных замечаний по работе нет.

Материалы, представленные в автореферате, демонстрируют, что представленная диссертационная работа Юровой К.А. по актуальности, методическому уровню, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости результатов соответствует требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени доктора медицинских наук п.9 и п.14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», а ее автор, Юрова К.А. заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Согласен на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных.

ведущий научный сотрудник
лаборатории иммунопатофизиологии
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института иммунологии и физиологии
Уральского отделения Российской академии наук,
Заслуженный деятель науки
Российской Федерации,
д.м.н., профессор

А.В. Зурочка

22 января 2023 г.

На обработку персональных данных согласен

А.В. Зурочка

Данные об авторе отзыва:

Зурочка Александр Владимирович, Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106, тел. 89193077598, E-mail: av_zurochka@mail.ru

Подпись Зурочка А.В. заверяю
главный специалист по кадрам
ИИФ УрО РАН



Ю.А. Нахматулина

ОТЗЫВ

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

Ремоделирование кости непрерывный и пожизненный процесс, который заключается в работе остеокластов при удалении старой кости путем ее резорбции и остеобластов, формирующих новую кость. В здоровой кости эти процессы поддерживаются взаимодействием остеоцитов с механосенсорными процессами. Согласованность действий остеокластов, остеобластов и остеоцитов является ключевым в регуляции метаболизма костного матрикса и паракринной передаче сигналов, опосредуя ремоделирование кости. Полнота регенерации костной ткани (физиологической, репаративной, патологической) связана с уникальным клеточным составом, в частности, с интеграцией субпопуляций клеток мезенхимного происхождения. Стромальные стволовые клетки (ССК), взаимодействуя с компонентами врожденной иммунной системы, проявляют как противовоспалительные, так и провоспалительные эффекты. Эти процессы поддерживают гомеостаз и играют важную роль при ремоделировании кости. Несмотря на распространенность методов 2D-культивирования клеток, результаты исследований на клетках, культивируемых на поверхности пластика, некорректно применять на клеточные и тканевые структуры целостного организма. Такая модель культивирования *in vitro* имеет значительные отличия от естественного клеточного микроокружения в условиях *in vivo* и *in situ*. В данной работе проведено экспериментальное моделирование кооперации ССК и иммунных клеток *in vitro* в условиях дистантного сокультивирования *in vitro* иммунокомпетентных клеток и ССК человека в присутствии трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием. Сложное микроокружение различных типов клеток совместно с внеклеточными компонентами создаст ниши для стволовых клеток костного мозга. Они, как высокоспециализированные и динамичные микроструктуры поддерживают гемопоэтические стволовые клетки и регулируют дифференцировку ССК. Изучение различных взаимодействий компонентов ниши костного мозга необходимо для определения клеточных и молекулярных процессов костного ремоделирования.

В связи с вышеизложенным, актуальность работы, представленной в автореферате Юровой К.А., не вызывает сомнений и позволяет характеризовать работу диссертанта как своевременное и перспективное исследование.

Автором впервые продемонстрировано, что трехмерный матрикс с кальций-фосфатным покрытием является физиологическим раздражителем. Описан

значительный рост продукции клетками про- и противовоспалительных факторов, повышение экспрессии генов дифференцировки и созревания. Выявлена взаимосвязь этих факторов с изменением фенотипического профиля исследуемых клеточных культур. Активность клеток, их пролиферация, дифференцировка и выживание тесно связана за счет взаимодействия с экстрацеллюлярным матриксом и соседними клетками. Наноразмерные модификации поверхности на биомиметических материалах активнее используются специалистами в области тканевой инженерии. Кроме того, продукты биодеградации кальций-фосфатного покрытия искусственных имплантатов, предназначенных для регенерации костной ткани, такие как Ca^{2+} и фосфаты, оказывают дополнительный регуляторный эффект на клеточные культуры. Представленные данные раскрывают принципиально новые гуморальные и клеточные механизмы физиологической регенерации костной ткани в условиях 3D моделирования. Выявлены ключевые взаимодействия между основными участниками ремоделирования кости - ССК и иммунокомпетентными клетками, и прототипом естественного межклеточного вещества костной ткани, матрикса с кальций-фосфатным покрытием.

Особо следует отметить хорошо продуманный дизайн исследования, который отражает все этапы работы, соответствует поставленной цели и задачам. В исследовании использованы современные методы и большой объем наблюдений, которые не вызывают сомнения, в достоверности полученных авторов данных. По теме диссертации опубликовано 45 печатных работ, из них 19 статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Следует отметить, что работа осуществлена при финансовой поддержке различных организаций (Российского научного фонда, Совета по грантам Президента Российской Федерации, Государственного задания). Практический аспект работы Юровой К.А. удостоен премии Калининградской области "Эврика" за разработки в области науки, технологий и инновационной деятельности за работу «Разработка инновационной панели прогностических биомаркеров остеоинтеграции и регенерации костной ткани при сложных переломах и операциях остеосинтеза». Кроме того, результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе образовательного научного кластера «Институт медицины и наук о жизни (ОНК МЕДБИО)» БФУ им. И. Канта г. Калининград, а также в научно-исследовательской работе лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии ИЭИМ УрО РАН г. Пермь.

Положения, выносимые на защиту, и выводы диссертации, сделанные автором, являются логическим завершением выполненного исследования, убедительны, корректны, в полной мере раскрывают научную новизну и практическую значимость работы.

Анализ автореферата Юровой К.А. показал, что диссертационная работа на тему «Кооперация стромальных стволовых и иммунных клеток на *in vitro* модели регенерации костной ткани» представляет собой самостоятельное законченное научное исследование, выполненное по актуальной проблеме современной клеточной биологии, и полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор – Юрова Кристина Алексеевна заслуживает присуждения степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Доктор медицинских наук,
заместитель генерального директора,
руководитель отдела по разработке
и исследованиям в области иммунологии
ООО «Текон Медицинские приборы»

/Е.В. Абакушина/

«25» января 2024 г.

Подпись доктора медицинских наук Абакушиной Елены Вячеславовны «заверяю»

Генеральный директор ООО «ТЕКОН МТ» -
управляющей организации ООО «ТЕКОН МП»



/Пресняков В.В./

Контактная информация: Общество с ограниченной ответственностью «Текон Медицинские приборы» (ООО «Текон МП»), отдел по разработке и исследованиям в области иммунологии.

123298 РФ, г. Москва, ул. 3-я Хорошевская д.16, корп.2, тел.: +7(495)730-41-12;
email: abakushina@tecon.ru

ОТЗЫВ

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

Стромальные стволовые клетки активно взаимодействуют с компонентами врожденной иммунной системы. Стволовые клетки способны проявлять как противовоспалительные, так и провоспалительные эффекты, определяющие поддержание гомеостатического баланса. Являясь гипоиммуногенными или иммунопривилегированными, стволовые клетки обладают выраженными иммуномодулирующими свойствами. Активация, пролиферативная активность и уровень продукции цитокинов иммунными клетками способны изменяться под воздействием факторов стромальных стволовых клеток. Кроме того, стволовые клетки могут регулировать врожденные и адаптивные иммунные реакции в условиях *in vitro* и *in vivo*. В тоже время жизнеспособность и функциональная активность стволовых клеток зависят от условий микросреды. Модификации цитокинового профиля клетками микроокружения модулируют специфику функционирования стромальных стволовых клеток. В связи с вышесказанным, тема диссертационной работы Юровой К.А., посвященная выявлению клеточных и молекулярных аспектов, определяющих формирование эффективной кооперации стромальных стволовых и иммунных клеток крови человека на *in vitro* модели регенерации костной ткани, чрезвычайно актуальна и своевременна. Несмотря на успешное развитие остеоиммунологии, до сих пор остаются неизвестными тонкие механизмы формирования гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге и их роль в ремоделировании костной ткани. Ниша костного мозга формируется сложным микроокружением различных типов клеток и внеклеточными компонентами. Эти элементы регулируют баланс между состоянием покоя и активацией гемопоэтических стволовых клеток и после активации клеток способны определять судьбу клеточной пролиферации, самообновления и/или дифференцировки. Эффекты трехмерного окружения зависят от множества факторов, включая, природу каркаса и источник происхождения стволовых клеток. Влияние трехмерного культивирования может распространяться не только на жизнеспособность и пролиферацию стволовых клеток, но и на их остеогенную дифференцировку. Помимо прямого влияния на характеристики стволовых клеток 3D-культура модулирует также регенеративный потенциал их секретомы. Культивирование сфероидов, относящееся к трехмерной структуре, может снизить противовоспалительный и иммуномодулирующий потенциал стромальных стволовых клеток, большинство секретомы, продуцируемых стволовыми клетками в 3D-гидрогелях, обладают более высокими противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами и в целом более высокой регенеративной способностью.

В представленном исследовании Юровой К.А. показано, что физические свойства материалов регулируют судьбу стволовых клеток. Шероховатость поверхности трехмерного матрикса оказывает влияние на дифференцировку клеточной культуры при контактном взаимодействии с искусственным

трехмерным матриксом, и в условиях дистантного взаимодействия посредством деградации кальцийфосфатного покрытия и высвобождения ионов Ca^{2+} .

Юрова К.А. продемонстрировала отрицательные корреляционные ассоциации между содержанием клеток с фенотипом CD45,34,14,20 с количеством стромальных стволовых клеток, в том числе с CD90 и CD105 позитивными клетками. Данные подтверждают скоординированность процессов, протекающих в популяциях гемопоэтических и стромальных стволовых клеток. Изменение пула маркеров CD73, CD90 и CD105 на мембране стволовых клеток, оказывает значительное влияние на дифференцировку клеток в направлении остеобластов. Кроме того, в работе Юрова К.А. выявила повышенную экспрессию генов RUNX, BMP6 и ALPL при трехмерном культивировании стволовых клеток *in vitro*, что связано с дифференцировкой клеток в остеобласты и ранними этапами минерализации внеклеточного матрикса, обусловленными, преимущественно, выходом ионов кальция из кальций-фосфатного покрытия. Соискателем впервые показана положительная взаимосвязь увеличения площади участков минерализации внеклеточного матрикса после 21 суток культивирования стволовых клеток с ростом уровня остеокальцина в супернатантах клеточных культур и увеличением количества клеток с морфологическими признаками кроветворных, идентифицируемых на пластике около образцов/матрикса.

Научную новизну имеют данные, свидетельствующие, что дифференцировка стромальных стволовых клеток в остеогенном направлении более эффективна в трехмерной модели дистантного сокультивирования с иммунокомпетентными клетками. Это подтверждается достоверным снижением числа позитивных CD73, CD90 клеток, негативно коррелирующим с ростом экспрессии генов остеодифференцировки. Впервые получены данные о кооперации стволовых клеток с иммунокомпетентными, в формате смешанной культуры с трехмерным матриксом, способствующая росту уровня остеокальцина, повышению числа клеток с морфологией кроветворных и увеличению площади очагов минерализации. Эти процессы отражают дифференцировку стромальных стволовых клеток в остеогенном направлении.

В работе Юровой К.А. приводятся убедительные факты, демонстрирующие формирование микроокружения костномозговых лакун, посредством ауто- и паракринных процессов гуморального и межклеточного взаимодействия иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток человека, стимулирующих образование минерализованного костного матрикса, как тканевого элемента гемопоэиндуцирующего микроокружения, что может являться прототипом системы "кость/костный мозг" в условиях *in vitro*.

Следует отметить, что диссертационное исследование выполнено с использованием современных методов и методических подходов, высокотехнологичного оборудования, а также адекватных критериев статистической обработки результатов, что не даёт оснований сомневаться в достоверности полученных результатов. Полученные Юровой К.А. данные фундаментального характера внедрены в учебный процесс образовательного кластера «Институт медицины и наук о жизни (ОНК МЕДБИО)» БФУ им. И. Канта г. Калининград, а также в научно-исследовательскую работу лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии ИЭГМ УрО РАН г. Пермь.

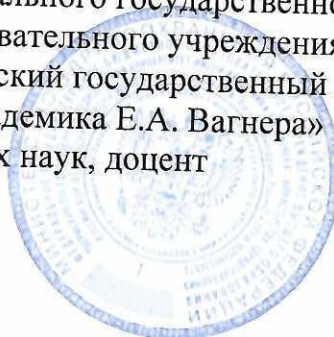
Поставленные цель и задачи в диссертационном исследовании достигнуты. По теме диссертации опубликовано 45 печатных работ, из них 19 статей в ведущих

рецензируемых журналах и изданиях, определённых ВАК РФ и 26 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов.

Принципиальных замечаний по работе нет.

Основываясь на материале, представленном в автореферате, диссертационная работа Юровой К.А. на тему «Кооперация стромальных стволовых и иммунных клеток на *in vitro* модели регенерации костной ткани» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология представляет собой научно-квалификационную работу, в которой на основании полученных автором данных разработаны положения, позволяющие ее считать крупным научным достижением в изучении новых гуморальных и клеточных механизмов физиологической регенерации тканей в трехмерном формате. Актуальность решаемых задач, научная новизна и теоретическая значимость полученных результатов, объем представленных данных и их статистический анализ, позволяют считать, что диссертационная работа К.А. Юровой соответствует требованиям п. 9 и п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г (в редакции постановления Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016; №748 от 02.08.2016), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а ее автор, Юрова К.А. заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Заведующая кафедрой гистологии, эмбриологии
и цитологии Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Пермский государственный медицинский
университет им. академика Е.А. Вагнера»
доктор медицинских наук, доцент



Н.П. Логинова

«01» февраля 2024г

На обработку персональных данных согласна

Данные об авторе отзыва:

Логинова Наталья Павловна, доктор медицинских наук, доцент. Заведующая кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь, ул. Петропавловская, 29, тел.: +79024759067; natalitsa@yandex.ru



ОТЗЫВ

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

Иммунокомпетентные клетки, в частности, Т-лимфоциты, играют ключевую роль в процессах физиологического и репаративного остеогенеза, приводящего к регенерации/ремоделированию костной ткани. Иммунные клетки и продуцируемые ими факторы способствуют костному гомеостазу. В свою очередь, остеобласты, остеокласты, остеоциты, и другие клетки костной ткани способны влиять на функциональный статус иммунных клеток. Каскады реакций, регулирующие процессы костного ремоделирования, инициируют иммунный ответ посредством активации клеток иммунной системы. Наряду с химическими и биологическими сигналами существуют физические факторы (в том числе эластичность, твердость, топография поверхности, с которой контактируют клетки), обладающие способностью оказывать влияние на жизнедеятельность клеток. В костной ткани остеокласты происходят из гемопоэтических клеток-предшественниц и относятся к высокоспециализированным иммунным клеткам. Кроме того, предшественники как остеокластов, так и остеобластов находятся в костном мозге. Именно в костном мозге они вступают в прямой контакт с предшественниками или непосредственно клетками памяти иммунной системы. Основной про-остеокластогенный цитокин RANKL способен контролировать не только дифференцировку остеобластов и остеокластов, но и функциональную активность активированных Т- и В-клеток. Одним из эффективных технических решений моделирования физиологического минерального вещества костной ткани являются кальцийфосфатные материалы, которые применяются в экспериментальных исследованиях и клинической практике. Использование в модельных системах *in vitro* кальцийфосфатных материалов представляет собой простой метод точного повторения комплекса регенеративных процессов *in vivo*. Клеточные структуры и функциональные пути реализации эффектов искусственных прототипов естественного межклеточного матрикса остаются на уровне предположений, несмотря на активные попытки изучения тонких механизмов ремоделирования костной ткани. В диссертационной работе Юрова К.А. обобщила роль иммунного микроокружения в регенерации костной ткани в контексте изучения механизмов продуктивной/эффективной кооперации иммунных клеток, секретируемых ими цитокинов с одной стороны и основных участников регенерации костной ткани - стромальных стволовых клеток, с другой.

Автором получены новые данные фундаментального характера. Юровой К.А. установлено, что трехмерный матрикс с кальцийфосфатным покрытием является неспецифическим физиологическим раздражителем. Показано, что

активность лимфоцитов приводила к выраженному синтезу молекул с про- и противовоспалительным, гемопоэтическим действием. Изменение функционального состояния клеток сопровождалось повышением экспрессии генов дифференцировки и созревания, что, в целом, коррелировало с изменением фенотипического профиля иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток. Автором доказано, что активация клеток инициирована неспецифическим раздражителем, без участия Т-клеточного рецептора. Также отмечено увеличение числа $CD45R0^+$ лимфоцитов иммунной памяти и дубль-позитивных изоформ [$CD45R0^+/CD45RA^+$] клеток, что является фенотипическим признаком дифференцировки наивных Т-клеток в Т-клетки памяти. Впервые выявлены обратные корреляционные взаимосвязи между числом $CD3^+CD45RA^+$ клеток и количеством $CD3^+CD45R0^+$ лимфоцитов, что подтверждает формирование субпопуляции Т-лимфоцитов памяти через дифференцировку в условиях, имитирующих регенерацию костной ткани. Продемонстрировано увеличение относительного содержания $CD3^+CD45R0^+$ Т-лимфоцитов в трехмерных культурах на фоне увеличения числа $CD45RA^+$ клеток. Юрова К.А. установила, что в присутствии неспецифического активатора – трехмерного матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань, Т-лимфоциты способны дифференцироваться в клетки иммунологической памяти, а также образовывать переходные, дубль-позитивные изоформы.

Полученные Юровой К.А. результаты расширяют представления о понимании межклеточной кооперации стромальных стволовых клеток и иммунокомпетентных клеток в модели регенерации костной ткани и могут быть использованы в качестве основы для разработок в области моделирования процессов регенерации.

В процессе выполнения диссертационного исследования автором сформулированы 9 выводов и 5 научных положений на основе массивной базы данных. Высокий уровень достоверности экспериментальных данных, полученных и представленных Юровой К.А., основан на достаточном объеме материала исследования, применении высокотехнологичных, точных и современных методов исследования (культуральные методы, проточная цитофлуориметрия, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ, оптическая микроскопия, компьютерная морфометрия), современного приборного комплекса, а также грамотного подбора критериев для статистической обработки полученных экспериментальных данных.

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. Работа соискателя поддержана несколькими фондами (РНФ, Советом по грантам Президента РФ, Государственным заданием и др.), что также свидетельствует об актуальности тематики.

Принципиальных замечаний по работе нет.

Содержание автореферата свидетельствует, что диссертационная работа Юровой К.А. соответствует требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени доктора медицинских наук, п. 9 и п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 №355, от 02.08.2016 №748, от 29.05.2017 №650, от 28.08.2017 №1024, от 01.10.2018 №1168), а ее автор, К.А. Юрова заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Главный научный сотрудник НИО лабораторной диагностики
НИЦ ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и
радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России
доктор медицинских наук, профессор *Н.М. Калинина* Калинина Наталья Михайловна
На обработку персональных данных согласна.

«12» *сентября* 2024 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» Министерства Российской Федерации по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий
Адрес: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д.4/2
Раб. тел.: 8 (812) 339-39-39; e-mail: medicine@nrcerm.ru

Подпись профессора *д.м.н. Калининой Н.М.* заверяю:
Ученый секретарь, *к.м.н. доцент*

Санников Санников Максим Валерьевич



ОТЗЫВ

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

Костная и иммунная системы тесно связаны посредством ряда общих регуляторных молекул, включая цитокины, хемокины, рецепторы и факторы транскрипции. Взаимодействуя друг с другом в костном мозге, костные и иммунные клетки совместно регулируют определенные функции костей, такие как каркас тела и рычаги для перемещения тела и его частей в пространстве, контроль минерального обмена и кроветворение. Так, тесная взаимосвязь между костью и иммунной системой была обнаружена, начиная с исследований, показавших, что факторы, активирующие остеокласты, секретируются клетками иммунной системы. В 2000 году термин остеоиммунология был введен в обращение, чтобы подчеркнуть взаимосвязь между биологией кости и иммунологией. Последующие исследования у генетически модифицированных мышей с ослабленным иммунитетом, дополнительно выявили физиологическое значение механизмов, общих для этих двух систем.

Доказанным фактом является тесная взаимосвязь между иммунной и скелетной системами, которая обусловлена взаимодействием клеток адаптивного иммунитета и клеток костной ткани, за счет влияния цитокинов, которые также оказывают действие на ремоделирование кости. Ремоделирование костной ткани представляет собой процесс, характеризующийся сбалансированной активностью остеокластов (клеток, резорбирующих костную ткань) и остеобластов (костеобразующие клетки). Остеобласты, в основном, дифференцируются стромальных стволовых клеток (ССК), тогда как остеокласты происходят из моноцитов, мигрирующих из костного мозга. Остеобласты контролируют ниши гемопоэтических стволовых клеток, обеспечивающих формирование предшественников клеток иммунной системы.

Создание искусственных 3D конструкций, которые по своим свойствам приближены к природному экстрацеллюлярному матриксу, затруднено и ограничено особенностями технологического процесса. Фосфаты кальция являются основным неорганическим компонентом костных тканей, их модулирующее действие на иммунокомпетентные клетки (ИК) крови и ССК изучено в достаточной мере. Однако, клеточные структуры и функциональные пути реализации эффектов искусственных прототипов естественного межклеточного матрикса остаются на уровне предположений, несмотря на активные попытки изучения тонких механизмов ремоделирования костной ткани. Кроме того, несмотря на большое количество работ, посвященных изучению аспектов, определяющих формирование эффективной кооперации ССК и иммунных клеток крови в процессах остеогенеза, тонкие клеточные и молекулярные аспекты этого процесса остаются до конца неизученными.

Таким образом, диссертационное исследование, проведенное К.А. Юровой, направленное на выявление общих закономерностей и особенностей кооперативного взаимодействия иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток в условиях дистантного трехмерного сокультивирования *in vitro* при

моделировании регенерации костной ткани, является своевременным и актуальным.

Юровой К.А. впервые было показано, что сокультивирование ИК и ССК в условиях дистантной 3D-модели способствует значительному снижению числа CD3⁺ клеток, несущих на своей поверхности маркеры ранней и поздней активации, при возрастании числа клеток, экспрессирующих на своей мембране молекулы созревания и дифференцировки. Соискателем впервые установлено, что 3D-модели дистантного сокультивирования ССК, повышение экспрессии генов остеодифференцировки (*RUNX2* и *ALPL*) позитивно коррелирует с ростом числа [CD45, CD34, CD14, CD20]⁺ клеток, на фоне снижения содержания про- (IFN γ , TNF α , TRAIL и IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10 и IL-13) молекул и, напротив, увеличения хемокина RANTES в среде культивирования. Кроме того, было убедительно продемонстрировано, что сокультивирование ИК и ССК в условиях 3D-модели, сопровождается увеличением секреции клетками смешанной культуры молекул с провоспалительным (IFN γ , TNF α и IL-6) и противовоспалительным (IL-4, IL-10 и IL-13) действием и хемокина RANTES. Юрова К.А. впервые установила, что 3D-модель дистантного сокультивирования в смешанном формате, способствует более эффективной дифференцировке последних в остеогенном направлении. Юровой К.А. впервые показано, что рост площади участков минерализации внеклеточного матрикса, выраженное в большей степени в 3D-смешанных культурах по истечении 21-суточного культивирования, положительно коррелирует с повышением уровня остеокальцина в супернатантах клеточных культур и ростом числа клеток с морфологическими признаками кроветворных, идентифицируемых на пластике около образцов/матрикса. Безусловную научную ценность представляют данные, резюмирующие, что формирование микроокружения костномозговых лакун, посредством ауто- и паракринных механизмов активной гуморальной и межклеточной кооперации иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток человека, потенцирует последние образовывать минерализованный костный матрикс, как тканевый элемент гемопозиндуцирующего микроокружения, что может являться прототипом системы "кость/костный мозг" в условиях *in vitro*.

Представленные в автореферате диссертационной работы данные не вызывают сомнения. Методы исследования соответствуют поставленным задачам и основаны на глубоком анализе современной научной литературы. Использование высокотехнологичного оборудования, а также адекватных критериев для статистической обработки результатов не вызывает сомнений в достоверности полученных результатов и сформулированных на их основе выводов. Девять выводов соответствуют полученным результатам диссертационной работы, структурированы и аргументированы.

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, 26 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов. Диссертационная работа Юровой К.А. выполнялась при поддержке грантов различных фондов, что подчеркивает актуальность выбранной темы исследования.

Принципиальных замечаний по написанию автореферата нет.

Основываясь на материале, представленном в автореферате, диссертационная работа Юровой К.А. на тему «Кооперация стромальных

стволовых и иммунных клеток на *in vitro* модели регенерации костной ткани» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология представляет собой научно-квалификационную работу, в которой на основании полученных автором данных разработаны положения, позволяющие ее считать крупным научным достижением в изучении новых механизмов регенерации костной ткани. Актуальность решаемых задач, новизна и теоретическая значимость полученных результатов, объем представленных данных, статистический анализ полученных данных, позволяет считать, что диссертационная работа Юровой Кристины Алексеевны соответствует требованиям п. 9 и п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г (в редакции постановления Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016; №748 от 02.08.2016), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а ее автор, Юрова К.А. заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Старший научный сотрудник
Лаборатории углеводов Федерального
Государственного Бюджетного Учреждения Науки
«Институт биоорганической химии им. Академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской Академии Наук,
доктор биологических наук

С.В. Хайдуков
15.02.2024

На обработку персональных данных согласен.

Данные об авторе отзыва: Хайдуков Сергей Валерьевич, доктор биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории углеводов, Федерального Государственного Бюджетного Учреждения Науки «Институт биоорганической химии им. Академиков. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской Академии Наук.

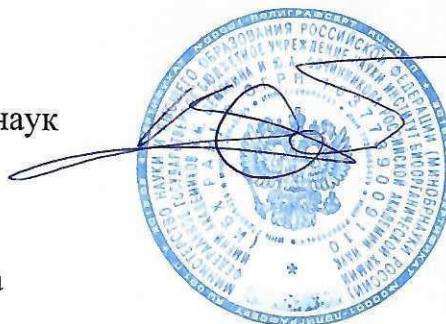
Почтовый адрес: 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

Телефон: +7(985) 923-41-62

Электронная почта: khsergey54@mail.ru

Подпись д.б.н. Хайдукова С.В. заверяю:

Ученый секретарь ИБХ РАН
Доктор физико-математических наук



Олейников В.А.

«15» 02 2024 года