

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию **Олжаева Фархада Сайдикаримовича** на тему:
«Морфофункциональные особенности репаративной регенерации костной ткани при использовании модифицированных мезенхимальных стволовых клеток», представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности **1.5.22. Клеточная биология**

Актуальность темы исследования

Актуальность работы **Ф. С. Олжаева** определяется сочетанием нескольких важнейших факторов клинической и фундаментальной значимости. Во-первых, переломы костей у лиц пожилого возраста представляют собой одну из актуальных проблем современной травматологии, особенно в условиях прогрессирующего старения населения. Нарушение регенерации костной ткани на фоне остеопороза связано, как с дефицитом клеток-предшественников остеобластов, так и с гиперактивностью остеокластов, что делает классические методы лечения недостаточно эффективными.

Во-вторых, применение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) рассматривается, как перспективная стратегия клеточной терапии в травматологии. Однако клиническая эффективность МСК ограничивается их возрастной дисфункцией и низкой аффинностью к костной ткани, особенно у пациентов пожилого возраста. Поэтому поиск методов повышения регенераторного потенциала МСК, а также направленной доставки этих клеток в зону повреждения кости приобретает особую актуальность.

В-третьих, поскольку возрастная дисфункция МСК ограничивает эффективность регенеративной терапии у пожилых пациентов, регуляция активности Cdc42 рассматривается как перспективный подход к восстановлению их репаративного потенциала. Изучение Cdc42 в этом контексте представляет собой важное и своевременное направление клеточной биологии, имеющее прикладное значение для разработки новых методов лечения переломов у пожилых пациентов.

В связи с выше изложенным, диссертационная работа **Олжаева Ф. С.**, целью которой стало изучение морфофункциональных особенностей репаративной

регенерации костной ткани у крыс при использовании модифицированных остеофильным полимером и таргетированных по Cdc42 аллогенных мезенхимальных стволовых клеток, является актуальной.

Научная новизна, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Научная новизна представленного исследования заключается в получении принципиально новых данных о возможностях целенаправленной модификации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для стимуляции процессов репаративной регенерации костной ткани в условиях остеопороза и возраст-ассоциированных нарушений остеогенеза.

Автором предложен и обоснован новый подход к стимуляции репаративной регенерации костной ткани – комбинированное применение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и синтетического остеофильного полимера. Впервые показано, что предварительная модификация МСК остеофильным бисфосфонат-содержащим полимером позволяет существенно усилить остеогенное действие клеточной терапии. Такой подход к регенерации костной ткани на фоне остеопороза защищен международным патентом, что подчеркивает оригинальность полученных результатов. Кроме того, впервые изучено влияние таргетирования белка Cdc42 регенераторный потенциал МСК при клеточной терапии переломов. В экспериментах *in vitro* автор продемонстрировал, что подавление активности Cdc42 в стволовых клетках повышает их остеогенную дифференцировку, миграционную способность и антиостеокластическое действие. В *in vivo* исследованиях было морфологически и морфометрически подтверждено, что использование модифицированных МСК способствует формированию зрелой костной ткани, повышению минеральной плотности регенерата, более раннему завершению фаз хондро- и остеогенеза, а также ремоделированию костной мозоли.

Полученные данные существенно дополняют существующие научные представления о механизмах репаративного остеогенеза и открывают новые возможности для целенаправленной активации регенеративных процессов в костной ткани.

Автором выдвинуты два положения, выносимые на защиту.

Положение 1 касается оценки биосовместимости синтетического остеофильного бисфосфонат-содержащего полимера и влияния ингибирования Cdc42 на функциональные свойства МСК *in vitro*. Новизна данного положения заключается в том, что впервые экспериментально показано: полимер не оказывает цитотоксического действия, не снижает пролиферативную активность и остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток, но при этом эффективно подавляет остеокластическую активность *in vitro* с достоверным снижением площади резорбции. Это демонстрирует терапевтический потенциал полимера как остеотропного носителя. Кроме того, было показано, что фармакологическое и генетическое подавление активности Cdc42 (с помощью малой молекулы CASIN и siRNA) усиливает остеогенный потенциал, миграционную способность и антиостеокластную активность МСК. Эти эффекты подтверждены комплексом *in vitro* методик: scratch-тестами, окраской алазарином, экспрессией остеогенных маркеров и снижением резорбции костного матрикса. Таким образом, положение опирается на экспериментально достоверные и воспроизводимые данные, полученные с использованием адекватных контролей и количественной оценки.

Положение 2 основано на *in vivo* оценке влияния мезенхимальных стволовых клеток, обработанных остеофильным полимером, на репаративную регенерацию костной ткани в модели остеопоротического перелома у самок крыс. Новизна положения заключается в экспериментальном подтверждении того, что предлагаемая предварительная обработка МСК улучшает показатели восстановления: по данным microCT установлено достоверное увеличение плотности костной ткани, а морфологический и гистологический анализ выявил формирование более зрелой костной мозоли. Полученные морфометрические данные свидетельствуют о выраженном структурно-функциональном созревании регенерата по сравнению с контрольными группами.

В отдельной серии *in vivo* экспериментов показано, что применение МСК, трансфицированных siRNA к Cdc42, приводит к более активному восстановлению пула остеогенных и хондрогенных клеток. В частности, выявлено увеличение количества остеобластов, остеоцитов и хондроцитов в зоне остеотомии, что подтверждает участие Cdc42 в регуляции остеогенной дифференцировки. Оба

набора данных подтверждены статистически достоверными различиями и опираются на сопоставление с соответствующими контролями, что придаёт положению надёжность и прикладную значимость.

Выводы и практические рекомендации, представленные в диссертационной работе, логично вытекают из целей и задач исследования, непосредственно основаны на полученных экспериментальных данных и подтверждены их воспроизводимостью. Они сформулированы на основании комплексного анализа результатов *in vitro* и *in vivo* экспериментов, выполненных с применением валидированных методик, статистической обработки и адекватных контрольных групп.

Все количественные показатели сопровождаются адекватной статистической обработкой, включая использование параметрических и непараметрических критериев, с указанием уровней статистической значимости. Объёмы выборок, число экспериментальных животных, наличие контрольных и сравнительных групп соответствуют требованиям биомедицинской экспертизы и позволяют делать обоснованные выводы.

Корректность применения моделей, прозрачность методологического подхода, воспроизводимость результатов, подтверждённых различными методами, а также внутренне логичная структура изложения обеспечивают полную аргументированность выводов. Практические рекомендации, представленные в работе, логически вытекают из полученных результатов и соответствуют современному уровню знаний в области клеточной биологии и экспериментальной травматологии.

Степень обоснованности и достоверности научных результатов диссертационного исследования

Научные результаты, представленные в диссертационной работе Ф. С. Олжаева, обладают высокой степенью достоверности, подтверждаемой согласованностью между результатами *in vitro* и *in vivo* экспериментов, применением актуальных моделей и адекватных количественных методик и статистического анализа.

На первом этапе исследования проведена комплексная оценка функциональных свойств модифицированных мезенхимальных стволовых клеток *in vitro*. Были изучены пролиферация (по данным теста Titer Glo), остеогенная дифференцировка

(уровень щелочной фосфатазы, окраска алазарином), миграционная способность (scratch-тест), а также влияние клеток на остеокластическую активность (TRAP-окраска и Pit Assay в условиях ко-культуры). Также *in vitro* проверены эффекты ингибирования Cdc42 с использованием малой молекулы CASIN и siRNA: установлено усиление остеогенного и миграционного потенциала МСК и снижение их проостеокластогенного действия.

Полученные *in vitro* данные послужили основанием для перехода к *in vivo* оценке эффективности подходов. В исследованиях на животных использованы три патофизиологически обоснованные модели: остеопороз, индуцированный овариэктомией у крыс самок; физиологическое старение у крыс самцов; и модель перелома локтевой кости. Эти модели отражают ключевые клинические ситуации, сопровождающиеся нарушением регенерации кости.

Для количественной оценки репаративного остеогенеза *in vivo* применялись микрокомпьютерная томография (microCT), морфологический и морфометрический анализ регенерата, окраска по Ван Гизону и гематоксилин-эозин. Показано, что предварительная модификация МСК остеофильным полимером, а также подавление Cdc42, способствует увеличению плотности костной ткани, улучшает структурно-функциональную организацию регенерата и усиливает восстановление клеточного состава в зоне повреждения. Эти данные служат подтверждением *in vitro* результатов и демонстрируют их применимость в условиях, моделирующих клиническую патологию.

Статистическая обработка данных проведена с использованием распределения вариационных рядов Kolmogorov-Smirnov и Shapiro-Wilk tests. Проверку статистических гипотез проводили непараметрическими критериями, не требующими соблюдения строгих ограничений. При сравнении сроков (один и шесть месяцев) использовали Mann-Whitney U Test для независимых выборок. Множественное сравнение четырех групп – ANOVA Kruskal-Wallis test.

По теме диссертации опубликовано достаточное количество работ, в том числе 1 международный патент на изобретение и 3 статьи в научных журналах и изданиях, включённых в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (3 статьи в

журналах категории K1, в том числе 1 публикация в журнале, входящем в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus и Web of диссертационного исследования.

Таким образом, достоверность и обоснованность научных результатов обеспечены логической преемственностью между этапами исследования, корректностью выбранных методик и статистической интерпретацией данных.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Результаты проведённого исследования способствуют углублению теоретических представлений о механизмах репаративной регенерации костной ткани, в частности — о роли модифицированных мезенхимальных стволовых клеток в активации остеогенеза при возраст-ассоциированных нарушениях. Установлено, что остеофильный полимер и ингибиторы Cdc42 влияют на остеогенную дифференцировку и ремоделирование костной ткани, что имеет важное значение для клеточной биологии, регенеративной медицины и экспериментальной морфологии.

Практическая значимость исследования заключается в возможности применения полученных данных для разработки новых биоинженерных подходов к лечению переломов, в том числе осложнённых нарушением остеогенеза на фоне остеопороза и старения. Полученные результаты могут быть использованы при разработке протоколов применения модифицированных МСК в составе клеточных продуктов медицинского назначения.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедр ортодонтии, восстановительных технологий и остеопатии ДПО; травматологии и ортопедии, а также гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, в экспериментальную работу Лаборатории биоинженерии и регенеративной медицины ЧУ «National Laboratory Astana» АОО «Назарбаев Университет» (Республика Казахстан).

Структура и оформление диссертации

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста, содержит 41 иллюстрацию и 2 таблицы, что обеспечивает наглядное представление основных результатов. Библиографический список включает 136 наименований, из которых

124 источника — на иностранных языках, что свидетельствует о глубокой проработке актуальной научной литературы.

Структура работы соответствует требованиям, установленным Положением о порядке присуждения учёных степеней: диссертация включает введение, обзор литературы, характеристику материалов и методов исследования, изложение полученных результатов, их обсуждение, выводы и практические рекомендации. Оформление текста, ссылок и иллюстративного материала выполнено в соответствии с действующими нормативными требованиями.

Замечания по диссертации:

екие редакторские и технические огрехи. В тексте встречаются единичные орфографические, пунктуационные и типографские недочёты, такие как двойные пробелы, пропущенные запятые или неравномерное выравнивание абзацев.

збыточная детализация технических протоколов. Некоторые разделы (например, описание приготовления раствора люциферина или условий инкубации с полимером) чрезмерно подробны и могут быть частично сокращены без ущерба для воспроизводимости эксперимента.

спользование термина «локтевая кость» без анатомической детализации. В тексте часто используется термин «перелом локтевой кости», но не уточняется уровень перелома (проксимальный, диафизарный, дистальный отдел), что могло бы помочь сопоставить результаты с клиническими случаями.

Все приведённые замечания носят частный и технический характер, не снижают научной значимости проведённого исследования и не влияют на общую положительную оценку работы.

По ходу анализа квалификационной работы Олжаева Ф.С возник ряд вопросов:

1. Чем обусловлен выбор именно локтевой кости для моделирования перелома? Можно ли экстраполировать полученные данные на диафизарные переломы у человека?

Почему, по Вашему мнению, даже через 6 месяцев сохранялись участки незрелой костной ткани, не смотря на стимулирующее воздействие?

Возможно ли, основываясь на результатах Вашей работы, уже сегодня

использовать предложенный Вами подход в клинической практик? И в каких клинических ситуациях?

Заключение

Диссертационная работа Фархада Сайдикаримовича Олжаева «Морфофункциональные особенности репаративной регенерации костной ткани при использовании модифицированных мезенхимальных стволовых клеток», является законченным научно-квалификационным исследованием, которое способствует решению актуальной задачи по оценке регенераторного потенциала мезенхимальных стволовых клеток, модифицированных полимером и клеток ингибированных Cdc42, на моделях остеопороза и возрастных животных. Диссертация полностью соответствует критериям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 01.10.2018 № 1168), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, доцент
Заместитель директора по научной работе
ФГБУ «Новосибирский НИИТО
им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России

Кирилова Ирина Анатольевна

Дата: «30» мая 2025 г.

Данные об авторе отзыва:

Кирилова Ирина Анатольевна - доктор медицинских наук, доцент учебно-методического отдела, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения «Новосибирский научно исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я. Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 630091, г.Новосибирск, ул. Фрунзе, 17. Сот. +7 9139580961, e-mail: iikirilova@niito.ru

