

## УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научно-технологическому  
развитию ФГАОУ ВО Первый МГМУ  
им. И.М. Сеченова Минздрава России  
(Сеченовский Университет)  
Доктор фармацевтических наук, доцент

\_\_\_\_\_ В.В. Тарасов

\_\_\_\_\_ 20 25 г.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### **ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)**

на основании решения заседания Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Диссертация «Регуляция экспрессии белков и генов, связанных с провоспалительной поляризацией макрофагов, под действием внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток» на соискание ученой степени кандидата биологических наук выполнена в Институте регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Ключерев Тимофей Олегович, 1998 года рождения, гражданство Российская Федерация, окончил федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова

Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) в 2021 году по специальности «Фармация».

В 2021 году зачислен в число аспирантов 1-го курса на очную форму обучения по основной профессиональной образовательной программе высшего образования – программе подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по направлению подготовки 06.06.01. Биологические науки.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов №2156/Ао выдана в ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

С 2023 года работает в должности младшего научного сотрудника «Лаборатории клинических смарт-нанотехнологий» Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по настоящее время.

#### **Научные руководители:**

Тимашев Петр Сергеевич, доктор химических наук, профессор, научный руководитель Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Власова Ирина Ивановна, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник Отдела современных биоматериалов Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Текст диссертации был проверен в системе «Антиплагиат» и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

По итогам обсуждения диссертационного исследования «Регуляция экспрессии белков и генов, связанных с провоспалительной поляризацией макрофагов, под действием внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток», представленного на соискание ученой степени кандидата

биологических наук по специальностям 1.5.3. Молекулярная биология, 1.5.22. Клеточная биология принято следующее заключение:

- **Оценка выполненной соискателем работы**

Выполненная работа представляет собой законченную, самостоятельную научно-квалификационную работу. В рамках научно-исследовательской работы впервые проведено сравнение противовоспалительного потенциала двух типов внеклеточных везикул, полученных из мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека, а именно матрикс-связанных везикул и внеклеточных везикул из секрета клеток того же источника. Впервые было проведено комплексное сравнение влияния описанных выше внеклеточных везикул на регуляцию функциональной активности макрофагов, дифференцированных из моноцитов периферической крови человека, сопоставлен их терапевтический потенциал на модели остеоартрита у животных. В целом, работа Ключерева Т.О. «Регуляция экспрессии белков и генов, связанных с провоспалительной поляризацией макрофагов, под действием внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток» представляет собой комплексное научное исследование, соответствующее требованиям научной новизны и актуальности. В ходе работы была проведена характеристика мезенхимных стромальных клеток, было осуществлено сравнение морфологии, размеров, протеомного состава матрикс-связанных везикул и внеклеточных везикул, полученных из кондиционированной среды мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека. В рамках диссертационного исследования был проведен анализ влияния обоих типов внеклеточных везикул, полученных из мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека, на экспрессию генов и белков, связанных с провоспалительной поляризацией макрофагов человека. Также сравнивали эффекты данных внеклеточных везикул на функциональную активность макрофагов человека, а именно на секреторную активность, продукцию активных форм кислорода, способность к фагоцитозу. В ходе работы был выяснен механизм влияния матрикс-связанных везикул, полученных из

мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека, на модуляцию свойств провоспалительного M1 фенотипа макрофагов человека. С помощью иммуногистохимического анализа установлены эффекты внеклеточных везикул обоих типов на протекание воспалительного процесса в тканях коленного сустава крыс с моделированным посредством менискэктомии остеоартритом. Работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

- **Актуальность темы диссертационного исследования**

Воспаление играет ключевую роль в патогенезе многих заболеваний, включая остеоартрит, аутоиммунные и нейродегенеративные патологии. Несмотря на достижения современной медицины, существующие методы лечения нередко характеризуются ограниченной эффективностью. Среди клеток врожденного иммунитета особое место занимают макрофаги, обладающие выраженной фенотипической пластичностью. M1 макрофаги обеспечивают антимикробную защиту и поддерживают воспалительный процесс, однако при чрезмерной активации могут вызывать повреждение тканей. В свою очередь, M2 макрофаги обладают противовоспалительными и регуляторными свойствами, способствуя разрешению воспаления и регенерации поврежденных тканей. Одним из перспективных подходов в терапии патологий, развитие которых обусловлено хроническим воспалением, являются мезенхимные стромальные клетки (МСК) и производные их секрета, такие как внеклеточные везикулы (ВВ). ВВ, выделенные из МСК, обладают способностью модулировать воспаление, снижая поляризацию макрофагов в направлении M1 и усиливая развитие M2 фенотипа. Экзосомы, как наиболее изученный тип ВВ, уже показали потенциал для терапии воспалительных и дегенеративных заболеваний.

Недавно выделенный класс ВВ – матрикс-связанные везикулы (МСВ) – получают путем децеллюляризации и протеолиза внеклеточного матрикса мягких тканей. МСВ продемонстрировали способность регулировать фенотип макрофагов, способствуя снижению провоспалительной активности M1

макрофагов и стимулируя M2 поляризацию, что способствовало ослаблению воспаления и деструктивных процессов в суставах на примере модели ревматоидного артрита у животных. Однако большинство исследований иммуномодулирующих эффектов МСВ выполнены с использованием везикул, полученных из децеллюляризованного внеклеточного матрикса мягких тканей млекопитающих, и отсутствуют данные о действии МСВ, полученных из МСК, на макрофаги человека, дифференцированные из моноцитов. Кроме того, ранее не проводилось прямого сравнения свойств МСВ и жидкофазных ВВ, выделенных из МСК.

В рамках данного исследования представлены результаты анализа влияния МСВ и ВВ из кондиционированной среды мезенхимных стромальных клеток на функциональную активность макрофагов человека. В ходе исследования был охарактеризован протеомный состав обоих типов внеклеточных везикул, полученных из мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека, и установлен вероятный механизм противовоспалительного действия МСВ в отношении M1 макрофагов человека. В рамках данного исследования проведено сравнение противовоспалительных свойств, указанных выше ВВ при их применении в процессе терапии на животной модели остеоартрита у крыс.

• **Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации**

Научные результаты, обобщенные в научной работе Ключерева Т.О., получены им самостоятельно в ходе работы в Институте регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Автору принадлежит ведущая роль в характеристике свойств внеклеточных везикул, первичных культур мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, макрофагов человека, дифференцированных из моноцитов и ТНР-1 клеток. Автором был проведен анализ влияния внеклеточных везикул на секреторную активность макрофагов и их фенотипическую пластичность с

помощью иммуноферментного анализа, количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, вестерн-блоттинга, проточной цитометрии, анализ фагоцитоза проводили с помощью проточной цитометрии, анализ радикал-генерирующей активности с помощью люминол-зависимой хемолюминесценции, иммуногистохимический анализ был использован для характеристики образцов тканей животных. Автор самостоятельно планировал и проводил эксперименты, выполнял статистическую обработку данных, анализировал и интерпретировал результаты. Автор представлял полученные результаты исследований на конференциях, проводил анализ литературы и осуществлял написание научных публикаций по теме данного исследования.

- **Степень достоверности результатов проведенных исследований**

Достоверность полученных результатов определяется репрезентативным объемом биологических образцов, используемых в клеточных и молекулярно-биологических тестах. Объем выборки был предварительно рассчитан при планировании экспериментов в условиях *in vitro* и *in vivo*. В процессе характеристики фенотипических признаков клеточных культур и линий, используемых в данном исследовании, были получены гистограммы и первичные данные проточной цитометрии мезенхимных стромальных клеток, макрофагов, дифференцированных из моноцитов, ТНР-1 макрофагов, подтверждающие характерные для данных клеток иммунные фенотипы. В ходе анализа морфологии и размеров ВВ первичные данные были получены с помощью анализа динамического светорассеяния наночастиц, а также микрофотографий просвечивающего электронного микроскопа и конфокального микроскопа. При исследовании с помощью клеточных и молекулярно-биологических тестов *in vitro* влияния ВВ из МСК на функциональную активность макрофагов, дифференцированных из моноцитов человека, а также на экспрессию белков и генов, связанных с их провоспалительной активацией, было сделано не менее 3-х независимых экспериментов в каждой группе, которые были учтены в статистическом анализе результатов. В *in vivo* исследовании терапии ОА ВВ использовались

особи крыс линии Wistar мужского пола возрастом от 3-6 месяцев, с целью уменьшения влияния возрастных, гормональных и половых различий между особями. Объем выборки животных был не меньше 6 животных на 1 экспериментальную группу. В исследовании были использованы 24 животных. Достоверность полученных результатов подтверждается применением современных и сертифицированных реактивов и оборудования. Для статистической обработки данных использовались строгие статистические критерии с использованием специализированного статистического программного обеспечения «GraphPad Prism 9».

- **Научная новизна результатов проведенных исследований**

В настоящей работе был впервые проведен анализ протеомного профиля МСВ и ВВ из кондиционированной среды (ВВ/КС), полученных из МСК пупочного канатика человека (МСК-ПК). Изучено влияние МСВ и ВВ/КС из МСК-ПК на функциональную активность макрофагов, дифференцированных из моноцитов, включая их секреторную активность, фагоцитоз и генерацию активных форм кислорода; установлен предполагаемый механизм противовоспалительного действия МСВ в отношении М1 макрофагов, который состоит в ингибировании компонентов сигнального пути JAK/STAT1, включая STAT1, STAT2 и IRF9; впервые установлены противовоспалительные эффекты МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК-ПК, при терапии животной модели остеоартрита, индуцированного менискэктомией.

- **Практическая значимость проведенных исследований**

Данное диссертационное исследование посвящено изучению фундаментальных механизмов регуляции активности макрофагов человека, дифференцированных из моноцитов, с использованием внеклеточных везикул, таких как МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК-ПК. В работе проанализированы эффекты этих внеклеточных везикул на секрецию цитокинов, экспрессию фенотипических маркеров, продукцию активных форм кислорода и фагоцитарную активность макрофагов человека, полученных из моноцитов периферической крови. Кроме того, проведен анализ влияния МСВ и ВВ/КС

из МСК-ПК на развитие воспаления при остеоартрите. Полученные результаты могут способствовать разработке новых терапевтических стратегий, основанных на применении внеклеточных везикул из МСК в качестве терапевтической платформы для лечения воспалительных и дегенеративных заболеваний суставов, включая остеоартрит.

- **Ценность научных работ соискателя ученой степени**

Автором был проведен анализ фенотипических различий и функциональной активности ТНР-1 макрофагов и макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови человека, были установлены различия в фагоцитозе и генерации активных форм кислорода между различными фенотипами человеческих макрофагов. Автором был проведен анализ протеомного профиля МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК-ПК, также была проведена характеристика описанных выше ВВ. Были установлены противовоспалительные эффекты МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК-ПК, на макрофаги человека, дифференцированные из моноцитов периферической крови, и был осуществлен анализ влияния данных ВВ на модуляцию воспалительного процесса в тканях коленных суставов крыс с индуцированным посредством менискэктомии остеоартритом.

Полученные данные могут способствовать дальнейшему исследованию фенотипических различий макрофагов в отношении их функциональной активности, включая фенотипическую секреторную активность и их редокс-активацию *in vitro*. Результаты исследования расширяют представление о влиянии МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК-ПК, на функциональные свойства макрофагов, такие как секреция цитокинов, фагоцитарная активность и генерация активных форм кислорода. Также данное исследование предоставляет ценную научную информацию о модуляции описанными выше различных субпопуляций ВВ экспрессии белков и генов, связанных с провоспалительной активацией макрофагов. Кроме того, полученные данные позволяют предположить возможный механизм противовоспалительного действия МСВ в отношении М1 макрофагов. В настоящем исследовании также

были охарактеризованы эффекты МСВ и ВВ/КС из МСК-ПК на развитие остеоартрита, что может послужить основой для разработки новых терапевтических подходов с использованием внеклеточных везикул МСК.

- **Внедрение результатов диссертационного исследования в практику**

Данные, полученные в результате проведенного исследования, расширяют представление о влиянии ВВ на фенотипическую пластичность и функциональную активность макрофагов человека. Результаты, полученные на животной модели ОА, могут быть использованы для разработки перспективных терапевтических стратегий для терапии ОА. Результаты исследования были внедрены в учебный процесс Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) при изучении дисциплин «Введение в регенеративную медицину», «Молекулярно-биологические основы регенеративной медицины», читаемых для студентов по направлениям подготовки 06.04.01. Биология, 28.04.03. Наноматериалы, 22.04.01. Материаловедение и технологии материалов (акт о внедрении результатов диссертации № 712 от 10.07.2025).

- **Этическая экспертиза научного исследования в Локальном этическом комитете (по медицинским и фармацевтическим наукам)**

Постановили: одобрить исследование в рамках диссертационной работы «Регуляция экспрессии белков и генов, связанных с провоспалительной поляризацией макрофагов, под действием внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток» (исполнитель – Ключев Тимомфей Олегович), протокол № 15-25 от 03.07.2025 очередного заседания Локального этического комитета ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

- **Научная специальность, которой соответствует диссертация**

Диссертация соответствует Паспорту научной специальности 1.5.3. Молекулярная биология, пунктам направлений исследований 3, 8 и 10: п. 3. Структура геномов, геномика, эпигеномика и транскриптомика.

Биоинформатические методы анализа баз данных последовательностей ДНК, РНК и белков, в том числе при патологии у человека; п. 8 Биосинтез белка. Посттрансляционные модификации белков. Механизмы транспорта и деградации белков. Протеомика; п. 10. Внутри- и межклеточные взаимодействия, рецепция и передача сигналов, лиганд-рецепторные взаимодействия.

Диссертация соответствует также Паспорту научной специальности 1.5.22. Клеточная биология, пунктам направлений исследований 7 и 10: п. 7. Везикулярный транспорт и механизмы его регуляции. Межклеточный транспорт; п. 10. Изучение закономерностей цито- и гистогенеза, клеточной дифференцировки, физиологической и репаративной регенерации тканей, также, регуляции этих процессов.

**• Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем**

По результатам исследования автором опубликовано 12 работ, в том числе 3 научные статьи в изданиях, индексируемых в международных базах Scopus, PubMed, 2 иные публикации по результатам исследования, 7 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 1 зарубежная конференция).

Оригинальные научные статьи в научных изданиях, включенных в международные, индексируемые базы данных Scopus, PubMed:

1) The Therapeutic Potential of Exosomes vs. Matrix-Bound Nanovesicles from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells in Osteoarthritis Treatment / T.O. Klyucherev, M.A. Peshkova, D.P. Revokatova, [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25. – № 21. – 11564. – P. 1–22. doi: 10.3390/ijms252111564. PMID: 39519121; PMCID: PMC11545893.

2) Four sides to the story: A proteomic comparison of liquid-phase and matrix-bound extracellular vesicles in 2D and 3D cell cultures / M. Peshkova, A. Korneev, D. Revokatova, [et al.] // Proteomics. – 2024. – Vol. 24. – № 18. – Article e2300375. – P. 1–17. doi: 10.1002/pmic.202300375. PMID: 38197488.

3) Radical-Generating Activity, Phagocytosis, and Mechanical Properties of Four Phenotypes of Human Macrophages / S.K. Suleimanov, Y.M. Efremov, T.O. Klyucherev, [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25. – № 3. – 1860. P. 1–25. doi: 10.3390/ijms25031860. PMID: 38339139; PMCID: PMC10855323.

Иные публикации по теме диссертационного исследования:

1) Direct and cell-mediated EV-ECM interplay / O. Smirnova, Y. Efremov, T. Klyucherev, [et al.] // Acta Biomaterialia. – 2024. – Vol. 186. – P. 63–84. doi: 10.1016/j.actbio.2024.07.029. PMID: 39043290.

2) Advances in Regenerative Therapies for Inflammatory Arthritis: Exploring the Potential of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles / T.O. Klyucherev, M.A. Peshkova, M.D. Yurkanova, [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Vol. 26(12). – Article 5766. doi: 10.3390/ijms26125766.

Материалы конференций по теме диссертационного исследования:

1) Klyucherev T.O., Suleimanov S.K., Koteneva P.I., Kosheleva N.V., Vlasova I.I., Timashev P.S., Extracellular vesicles reduce M1 macrophage polarization // Abstract book VI Sechenov International Biomedical Summit 2022 (SIBS-2022). – 2022. - p. 8.

2) Ключерев Т.О., Регуляция воспалительной и радикал-продуцирующей активности фагоцитов внеклеточными везикулами // Сборник тезисов докладов участников V Международной научной конференции «Наука будущего» и VIII Всероссийского молодежного научного форума «Наука будущего – наука молодых» – 2023. - с. 105.

3) Ключерев Т.О., Сулейманов Ш.К., Юрканова М.Д., Теплова А.А., Власова И.И., Тимашев П.С., Иммуномодуляция про-воспалительной активности нейтрофилов и макрофагов внеклеточными везикулами // Сборник тезисов XXIV съезда физиологического общества им. И.П. Павлова – 2023 - с. 94.

4) Корнеев А.А., Пешкова М.А., Ключерев Т.О., Кошелева Н.В., Тимашев П.С., Функциональная характеристика внеклеточных везикул методами сравнительной протеомики // Сборник тезисов VII Сеченовского международного биомедицинского саммита: Мегатренды в биомедицине (SIBS-2023). – 2023. - с. 34.

5) Ключерев Т.О., Юрканова М.Д., Кошелева Н.В., Власова И.И., Тимашев П.С., Модулирование иммунного ответа макрофагов внеклеточными везикулами, полученными из мезенхимальных стромальных клеток пуповины человека // Сборник тезисов VIII Международного биомедицинского саммита (SIBS-2024). – 2024. - с. 14.

6) Klyucherev T., Yurkanova M., Peshkova M., Kosheleva N., Vlasova I., Timashev P., Modulation of The Inflammatory Response of Macrophages by Mesenchymal Stromal Cells-Derived Exosomes and Matrix-Bound Nanovesicles // Сборник материалов Royan International Hybrid Twin Congress – 2024. - p. 154.

7) Ключерев Т.О., Юрканова М.Д., Пешкова М.А., Кошелева Н.В., Власова И.И., Тимашев П.С., Модуляция воспалительного ответа макрофагов экзосомами и матрикс-связанными нановезикулами, полученными из мезенхимальных стромальных клеток пуповины человека // Сборник материалов VI Национального конгресса по регенеративной медицине. – 2024. - с. 441.

**Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на научных конференциях:**

1) Регуляция воспалительной и радикал-продуцирующей активности фагоцитов внеклеточными везикулами / Форум «Наука будущего – наука молодых», финальный этап (г. Орел, 20-23 сентября 2023 г., устный доклад).

2) Иммуномодуляция про-воспалительной активности нейтрофилов и макрофагов внеклеточными везикулами / XXIV съезд физиологического общества имени И. П. Павлова (г. Санкт-Петербург, 2023 г.; секционный доклад).

## Заключение

Диссертация соответствует требованиям п. 21 Положения о присуждении ученых степеней в ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом от 06.06.2022 № 0692/Р, и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

Первичная документация проверена и соответствует материалам, включенным в диссертацию.

Диссертационная работа Ключерева Тимофея Олеговича «Регуляция экспрессии белков и генов, связанных с провоспалительной поляризацией макрофагов, под действием внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.3. Молекулярная биология, 1.5.22. Клеточная биология.

Заключение принято на заседании Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Присутствовало на заседании 53 чел.

Результаты голосования: «за» – 53 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., выписка из протокола № 9 от 21 августа 2025 г.

### Председательствующий на заседании

Доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник  
Отдела современных биоматериалов  
Института регенеративной медицины  
Научно-технологического парка биомедицины  
ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова  
Минздрава России (Сеченовский Университет)



И.В. Уласов