



Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение

«Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической
иммунологии»

НИИФКИ

Ядринцевская, 14,
г. Новосибирск, 630099
телефон: (383) 222-26-74, факс: (383) 222-70-28
e-mail: info@niikim.ru
www.niikim.ru

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного научного учреждения

«Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической
иммунологии»

д.б.в. Силков А.Н.



«05» 02 2026г

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» о научно-практической значимости диссертационной работы Ключерева Тимофея Олеговича на тему «Регуляция экспрессии белков и генов, связанных с провоспалительной поляризацией макрофагов, под действием внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток», представленной к защите в диссертационный совет ДСУ 208.003.03 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 1.5.3. Молекулярная биология, 1.5.22. Клеточная биология

Актуальность темы исследования

Воспаление является универсальным патофизиологическим процессом, лежащим в основе широкого круга заболеваний, включая дегенеративные поражения опорно-двигательного аппарата. Ключевую роль в формировании и поддержании воспалительного ответа играют клетки врожденного иммунитета - макрофаги, которые, помимо противоинфекционной функции, участвуют в регуляции тканевого гомеостаза, ремоделировании внеклеточного матрикса и координации регенеративных процессов. Макрофаги обладают выраженной пластичностью и способны приобретать различные функциональные фенотипы, среди которых полярные формы представлены клетками с M1 провоспалительным и M2 противовоспалительным/регенераторным фенотипом. Нарушение соотношения M1 и M2 макрофагов рассматривается в качестве одного из ключевых факторов прогрессии воспалительного процесса и нарушения регенерации. Поэтому управление процессами поляризации и функционального перепрограммирования макрофагов в сторону M2 фенотипа рассматривается в качестве нового терапевтического подхода в регенеративной медицине. В этом аспекте большие перспективы связывают со стратегиями бесклеточной иммуномодулирующей терапии, основанной на применении секретомных продуктов мезенхимных стромальных клеток (МСК). Среди компонентов секрета МСК особый интерес вызывают внеклеточные везикулы (ВВ), способные направленно модулировать активность клеток иммунной системы за счет переноса регуляторных белков, липидов и нуклеиновых кислот. ВВ-МСК подавляют активность M1

макрофагов и стимулируют формирование M2-подобных фенотипов, что делает эти биологические наноструктуры потенциально привлекательной платформой для разработки лекарственных препаратов с более высоким профилем безопасности по сравнению с МСК (ввиду неспособности ВВ к репликации и опухолевой трансформации).

Большинство современных исследований сосредоточено на изучении свободно секретируемых ВВ, включая экзосомы и микровезикулы. Вместе с тем недавно описаны везикулы, связанные с компонентами внеклеточного матрикса (МСВ), которые продемонстрировали выраженные иммуномодулирующие свойства, включая подавление M1 поляризации макрофагов в различных моделях *in vitro* и *in vivo*. Значительная часть таких работ выполнена на МСВ, полученных из децеллюляризованных тканей животных, в то время как исследования МСВ из культур МСК человека, в том числе в сравнении с внеклеточными везикулами кондиционированной среды МСК (ВВ/КС) остаются крайне ограниченными. Кроме того, многие *in vitro* исследования проведены с использованием клеточных линий, например, RAW 264.7 или THP-1, свойства которых отличаются от свойств первичных макрофагов человека.

Особую клиническую значимость данные вопросы приобретают при остеоартрите - распространенном дегенеративно-воспалительном заболевании суставов, при котором дисбаланс M1 и M2 макрофагов играет существенную роль в развитии хронического локального воспаления. Современные фармакологические подходы к терапии остеоартрита обладают недостаточной эффективностью, что обуславливает актуальность поиска новых иммуномодулирующих стратегий терапии.

В этой связи диссертационное исследование Ключерева Тимофея Олеговича, посвященное сравнительному анализу различных субпопуляций ВВ МСК пуповины человека (МСК-ПК) и их влияния на функциональную активность и фенотипическую пластичность макрофагов человека, является актуальным и своевременным в области регенеративной медицины. Работа имеет существенное значение для развития фундаментальных представлений об иммунных механизмах регуляции воспалительного ответа и обоснования перспектив применения стратегий бесклеточной иммуномодулирующей терапии в лечении остеоартрита и других воспалительно-дегенеративных заболеваний.

Соответствие темы диссертации научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.3. Молекулярная биология согласно пунктам: 3. Структура геномов, геномика, эпигеномика и транскриптомика ...; 8. Биосинтез белка ...Протеомика; 10. Внутри- и межклеточные взаимодействия ... Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.22. Клеточная биология согласно пунктам: 7. Везикулярный транспорт... 10. Изучение физиологической и репаративной регенерации тканей...

Связь работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационная работа Ключерева Т.О. на тему: «Регуляция экспрессии белков и генов, связанных с провоспалительной поляризацией макрофагов, под действием внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток» выполнена в соответствии с планом и тематикой научно-исследовательской деятельности Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО ПМГУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

Научная новизна исследования и полученных результатов

В диссертационной работе Ключерева Т.О. впервые комплексно охарактеризованы иммуномодулирующие свойства различных субпопуляций внеклеточных везикул, а именно МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК пупочного канатика человека (МСК-ПК), в отношении макрофагов человека, дифференцированных из моноцитов. Автором установлено, что оба типа ВВ обладают выраженной способностью подавлять активацию/поляризацию макрофагов в сторону М1/провоспалительного фенотипа. Автором выполнен детальный анализ влияния исследуемых нановезикул на ключевые функциональные параметры макрофагов, включая секрецию провоспалительных цитокинов, экспрессию поверхностных маркеров, ассоциированных с М1- и М2-поляризацией, а также продукцию активных форм кислорода и фагоцитарную активность. Существенным элементом научной новизны является проведенная в рамках данной работы всесторонняя характеристика биологических свойств ВВ, дополненная впервые выполненным сравнительным анализом протеомного профиля МСВ и ВВ/КС, выделенных из МСК-ПК человека. В результате протеомного исследования выявлены выраженные качественные и количественные различия между двумя типами внеклеточных везикул. Установлено, что для МСВ характерно обогащение белками, участвующими в регуляции процессов фагоцитоза, эндоцитоза и активации иммунных клеток, тогда как ВВ/КС преимущественно содержат белки, положительно регулирующие синтез компонентов внеклеточного матрикса и биосинтез макромолекул.

Впервые в рамках данного исследования продемонстрированы различия в эффектах МСВ и ВВ/КС МСК-ПК на модуляцию экспрессии мРНК и белков ключевых компонентов сигнального каскада JAK/STAT1 в М1 макрофагах человека. Показано, что МСВ оказывают выраженное ингибирующее действие на экспрессию таких компонентов сигнального пути JAK/STAT1, как STAT1, STAT2 и IRF9. Важным и принципиально новым результатом работы является также экспериментальное обоснование терапевтического потенциала внеклеточных везикул МСК-ПК в контексте развития воспалительного процесса при остеоартрите. Установлено, что внутрисуставное введение МСВ, и в большей степени ВВ/КС приводит к подавлению воспалительного процесса в тканях коленных суставах крыс с хирургически индуцированным остеоартритом, что подтверждает перспективность применения данных субпопуляций ВВ в качестве основы для разработки новых подходов к терапии остеоартрита.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Результаты диссертационного исследования Ключерева Т.О. имеют существенное значение для развития фундаментальных представлений в области регуляции врожденного иммунитета и поляризации макрофагов. В работе расширены и уточнены современные данные о механизмах фенотипической пластичности макрофагов человека, опосредованных влиянием различных субпопуляций ВВМСК. Установлено, что обе субпопуляции ВВ оказывают выраженное противовоспалительное воздействие на М1 макрофаги, при этом их эффекты реализуются через частично различающиеся механизмы регуляции функциональной активности клеток. Показано, что данные эффекты затрагивают ключевые параметры макрофагальной функции, включая экспрессию провоспалительных медиаторов, уровень продукции активных форм кислорода,

фагоцитарную активность и профиль поверхностных маркеров. Выявленная ассоциация МСВ с ингибированием сигнального каскада JAK/STAT1 в M1 макрофагах имеет принципиальное значение для понимания молекулярных основ противовоспалительного действия данных наноструктур. Существенную научную ценность представляет выполненный в ходе диссертационного исследования сравнительный протеомный анализ МСВ и ВВ/КС МСК-ПК, подтвердивший особенности их белкового состава, что указывает на возможные различия в биологических эффектах данных субпопуляций ВВ как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Полученные результаты формируют основу для дальнейших исследований, ориентированных на целенаправленный выбор и оптимизацию состава ВВ с заданными иммунорегуляторными свойствами.

Практическая значимость диссертационной работы обусловлена экспериментальным подтверждением выраженного противовоспалительного эффекта МСВ и ВВ/КС МСК-ПК в доклинической модели остеоартрита у крыс. Продемонстрированная способность данных ВВ модулировать локальное воспалительное микроокружение в тканях сустава свидетельствует о перспективности их использования в качестве потенциального терапевтического средства для лечения остеоартрита. Результаты исследования внедрены в образовательный процесс Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет) в дисциплины «Введение в регенеративную медицину», «Молекулярно-биологические основы регенеративной медицины» по направлениям специальностей 06.04.01 «Биология», 28.04.03 «Наноматериалы», 22.04.01 «Материаловедение и технологии материалов».

Личный вклад автора

Ключевым Т.О. были осуществлены выделение, культивирование и комплексная характеристика клеточных культур мезенхимных стромальных клеток и макрофагов, дифференцированных из моноцитов человека. Для подтверждения фенотипических свойств МСК и макрофагов проведено их иммунофенотипирование с использованием метода проточной цитометрии. Автор провел анализ свойств ВВ, таких как оценка морфологии и размеров с помощью конфокальной микроскопии, динамического светорассеяния наночастиц. Экспрессия экзосомальных маркеров в ВВ была исследована автором с использованием метода вестерн-блоттинга. При изучении влияния внеклеточных везикул МСК на функциональную активность макрофагов Ключевым Т.О. самостоятельно провел эксперименты по оценке экспрессии мРНК и уровня секреции провоспалительных цитокинов, субъединиц ферментного комплекса НАДФН-оксидазы 2, а также внутриклеточных сигнальных белков с применением количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, вестерн-блоттинга, иммуноцитохимии и иммуноферментного анализа. С использованием проточной цитометрии автором выполнен анализ влияния МСВ и ВВ/КС на экспрессию поверхностных белковых маркеров, ассоциированных с M1- и M2-поляризацией макрофагов, а также на их фагоцитарную активность. Продукция активных форм кислорода макрофагами была исследована автором с помощью метода люминол-зависимой хемолуминесценции. В рамках исследований *in vivo* Ключевым Т.О. провел иммуногистохимический анализ образцов тканей коленных суставов при оценке влияния МСВ и ВВ/КС МСК-ПК на развитие воспалительного процесса в экспериментальной модели остеоартрита. Автор осуществлял статистическую обработку полученных

экспериментальных данных, принимал непосредственное участие в подготовке научных публикаций по теме диссертационной работы и представлял результаты исследования на профильных научных конференциях.

Рекомендации по использованию результатов работы и выводов диссертации

Результаты диссертационного исследования Ключерева Т.О. рекомендуется внедрить в образовательный процесс учреждений среднего профессионального и высшего образования медицинского и биологического профилей при реализации образовательных программ по направлениям подготовки и специальностям «Биология», «Молекулярная биология», «Клеточная биология», «Материаловедение и технологии материалов», а также смежным дисциплинам, связанным с иммунологией, регенеративной медициной и клеточными технологиями. Результаты диссертационного исследования рекомендуется использовать в лабораториях, занимающихся иммунологическими исследованиями, а также разработкой терапевтических подходов на применении биологических наночастиц клеточного происхождения для терапии воспалительных и дегенеративных заболеваний.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования Ключеревым Т.О. 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).

Оценка структуры и содержания диссертации

Диссертационная работа Ключерева Т.О. выполнена по монографическому принципу, изложена на 176 страницах машинописного текста и содержит все обязательные разделы, включая введение, обзор литературы, материалы и методы, четыре главы, содержащие результаты экспериментальных исследований, обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перечень сокращений и условных обозначений, а также список литературы из 319 источников, значительная часть которых представлена публикациями последних 5 лет. В тексте диссертации иллюстративный материал представлен 35 рисунками и 3 таблицами.

Во введении диссертационной работы обоснована актуальность темы исследования, корректно сформулированы цель и задачи исследования, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Автором представлены положения, выносимые на защиту, продемонстрировано соответствие диссертации паспорту заявленных специальностей, обоснован личный вклад автора, приведены сведения об апробации и публикации результатов исследования, а также дана характеристика структуры и объема диссертации.

Первая глава «Обзор литературы» содержит анализ современных научных данных о происхождении, фенотипическом разнообразии и функциональной пластичности макрофагов, их роли в регуляции врожденного иммунного ответа, регенерации тканей и патогенезе воспалительных и дегенеративных заболеваний. Существенное внимание уделено молекулярным механизмам M1 и M2 поляризации. В отдельном разделе рассмотрены ВВ, их классификация и биогенез, МСК как источник ВВ, а также

проанализированы современные представления о роли ВВ-МСК в иммунной регуляции на примере макрофагов и перспективы их применения при остеоартрите.

Во второй главе «Материалы и методы» изложены основные экспериментальные подходы, включая протоколы выделения и культивирования МСК и макрофагов, методы получения и характеристики МСВ и ВВ/КС, а также способы оценки их биологических эффектов. Автором использован широкий спектр современных методов клеточной и молекулярной биологии: проточная цитометрия, иммуноцитохимия, количественная ПЦР с обратной транскрипцией, ИФА, вестерн-блоттинг, люминол-зависимая хемилюминесценция, высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией. Отдельно описаны *in vivo* эксперименты, включая моделирование остеоартрита у крыс посредством менискэктомии, общий дизайн эксперимента и иммуногистохимическая оценка воспалительных изменений, а также статистические методы обработки данных.

Главы, посвященные результатам экспериментальных исследований (главы 3.1-3.4), последовательно отражают выполнение поставленных задач и содержат детальное описание полученных данных. В главе 3.1 представлена характеристика МСК как источника ВВ и описаны морфологические и молекулярные особенности МСВ и ВВ/КС. В главе 3.2 проанализировано влияние субпопуляций ВВ на фенотипические и функциональные свойства макрофагов, включая цитокиновый профиль, экспрессию маркеров, фагоцитоз и продукцию активных форм кислорода. В главе 3.3 рассмотрены эффекты МСВ и ВВ/КС на экспрессию генов и белков сигнального пути JAK/STAT1, ассоциированного с провоспалительной M1-поляризацией макрофагов. Глава 3.4 содержит результаты *in vivo* исследования влияния ВВ-МСК-ПК на воспалительный процесс при экспериментальном остеоартрите у крыс.

В разделе «Обсуждение» автором проведен развернутый анализ полученных результатов с их сопоставлением с данными современных отечественных и зарубежных исследований, что позволяет корректно интерпретировать выявленные эффекты и определить место выполненной работы в контексте актуальных направлений иммунологии и регенеративной медицины. Заключение содержит обобщение основных результатов исследования. Сформулированные выводы логично вытекают из представленного экспериментального материала и в полной мере соответствуют поставленным цели и задачам диссертационной работы.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертационная работа Ключерева Т.О. выполнена на высоком методическом и методологическом уровне и имеет междисциплинарный характер (на стыке дисциплин молекулярной и клеточной биологии), написана грамотным литературным языком, логична, последовательна и впечатляет объемом экспериментального материала. В рамках исследования представлены новые данные о иммуномодулирующих свойствах различных субпопуляций ВВ МСК человека в отношении макрофагов человека. В ходе данного исследования охарактеризованы эффекты МСВ и ВВ/КС МСК-ПК на ряд параметров биологической активности макрофагов: продукцию активных форм кислорода, фагоцитоз, экспрессию мРНК и белков, связанных с провоспалительной поляризацией макрофагов, включая экспрессию провоспалительных цитокинов, компонентов сигнального пути JAK/STAT1. В ходе прочтения диссертации к соискателю возник ряд вопросов:

1. В рамках исследований ВВ в условиях *in vitro* и *in vivo* довольно распространенным способом дозирования является нормирование по числу частиц. В рамках данного исследования ВВ были нормированы по содержанию белка методом ВСА. С чем связано предпочтение автора нормировать ВВ исключительно по белку, учитывая, что примесные белки могут попадать в образцы ВВ/КС и МСВ и оказывать влияние на биологические результаты?
2. В данном исследовании была проанализирована широкая панель маркеров, связанных с М1 поляризацией макрофагов. Однако в отношении маркеров поляризации в М2 состоянии макрофагов была проанализирована экспрессия CD206. Почему не был проведен анализ влияния ВВ-МСК-ПК на экспрессию других фенотипических и особенно функциональных/метаболических маркеров, связанных с М2 поляризацией макрофагов (IL-10, аргиназа-1, МерТК)?
3. При проведении протеомного анализа ВВ выявлены белки, регулирующие формирование внеклеточного матрикса, что может обуславливать регенераторный потенциал ВВ. А какие кандидатные белки могут участвовать в подавлении М1 поляризации и перепрограммировании макрофагов в сторону М2 фенотипа? Иными словами какие факторы в составе ВВ опосредуют противовоспалительную активность? Или это в большей степени прерогатива микро-РНК?
4. Автором выбрана удачная модель остеоартрита, которая воспроизводит естественное, медленно-прогрессирующее посттравматическое воспаление в отсутствие спонтанного выздоровления, что приближено к патогенезу остеоартрита человека. Почему в этой модели не оценили в полном объеме клиническую эффективность с использованием биохимических, функциональных и физических тестов, нацеленных на оценку ослабления воспаления (маркеры воспаления в синовиальной жидкости, выраженность синовита, диаметр сустава, тест на распределение нагрузки, поведенческие тесты) ?

Вышеперечисленные вопросы несут дискуссионный характер и не умаляют научной ценности полученных автором результатов исследования.

Заключение

Диссертационная работа Ключерева Тимофея Олеговича «Регуляция экспрессии белков и генов, ассоциированных с провоспалительной поляризацией макрофагов, под действием внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершенным научно-квалификационным исследованием, выполненным на современном методическом уровне и посвященным актуальной проблеме молекулярной и клеточной иммунологии. В диссертации комплексно изучены МСВ и ВВ/КС, полученные из МСК-ПК человека, включая их протеомный состав и иммунобиологические свойства в отношении макрофагов человека. Особое внимание уделено анализу механизмов регуляции функционального состояния макрофагов человека под действием указанных биологических нановезикул, в том числе на уровне экспрессии генов и белков, вовлеченных в сигнальные пути, связанные с М1-поляризацией и развитием провоспалительного ответа. Существенным научным вкладом диссертационной работы является экспериментально обоснованная демонстрация способности внеклеточных везикул МСК модулировать активность макрофагов с формированием популяции клеток с

M2-подобным противовоспалительным фенотипом, а также снижать выраженность воспалительного процесса в тканях коленного сустава в экспериментальной модели остеоартрита. Полученные в целом данные диссертационной работы расширяют современные представления о роли внеклеточных везикул МСК в регуляции врожденного иммунного ответа и подтверждают их перспективность в качестве новой платформы для разработки инновационных стратегий противовоспалительной и регенеративной терапии, что соответствует требованиям п. 16 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом ректора № 0692/Р от 06.06.2022 года (с изменениями, утвержденными: приказом №1179/Р от 29.08.2023г., приказом №0787/Р от 24.05.2024г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Ключерев Тимофей Олегович заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальностям 1.5.3. Молекулярная биология, 1.5.22. Клеточная биология.

Отзыв на диссертацию Ключерева Т.О. был обсужден и утвержден на заседании ученого совета Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ) «03» февраля 2026г. протокол №1.

Заместитель директора института по научной работе,
заведующий лабораторией клеточной иммунотерапии
НИИФКИ, член-корр. РАН,
доктор медицинских наук, профессор
3.2.7. Иммунология (14.00.36 Аллергология и иммунология)

03.02.2026


Черных Елена Рэмовна


Директор НИИФКИ,
доктор биологических наук
3.2.7. Иммунология (14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология)

03.02.2026


Силков Александр Николаевич

Подпись член-корр. РАН, доктора медицинских наук, профессора Черных Е.Р. и подпись
доктора биологических наук Силкова А.Н. заверяю:
Ученый секретарь НИИФКИ
кандидат биологических наук

«03» февраля 2026г.


Гаврилова Елена Давидовна

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)
Адрес: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14
Телефон: +7 383 222 2674, e-mail: info@niikim.ru