

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

**доктора биологических наук Шевалы Евгения Валерьевича,  
на диссертационную работу Ключерева Тимофея Олеговича на тему  
«Регуляция экспрессии белков и генов, связанных с провоспалительной  
поляризацией макрофагов, под действием внеклеточных везикул мезенхимных  
стромальных клеток», представленную в диссертационный совет ДСУ 208.003.03 при  
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. 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**

Существование клеток в составе любой ткани критическим образом зависит от сложного комплекса сигналов, получаемых каждой из клеток. Изучение этих сигналов составляет заметный раздел современной клеточной и молекулярной биологии, а также внесло множество новых идей в регенеративную медицину. Одним из наиболее изучаемых механизмов межклеточного сигналинга в настоящее время являются внеклеточные везикулы (ВВ), активное изучение которых создало несколько новых направлений в современной науке. Попытки использовать ВВ, секретлируемые различными клетками, является перспективным направлением регенеративной медицины, которое нацелено на восстановление физиологических функций поврежденных органов и тканей. При этом наибольший интерес представляют не общие эффекты ВВ, а их воздействие на ключевые компоненты развития разнообразных патологических процессов, среди которых особое значение имеют заболевания, связанные с развитием воспаления. В представленной диссертационной работе Ключерева Т.О. анализировались эффекты ВВ, полученных из мезенхимных стромальных клеток (МСК), на макрофаги человека, вовлеченные в развитие одного из распространенных, социально значимых заболеваний - остеоартрита. Таким образом, актуальность диссертационного исследования Ключерева Тимофея Олеговича не вызывает сомнения.

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

Диссертационная работа Ключерева Т.О. характеризуется достаточной степенью обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Полученные результаты опираются на продуманный дизайн исследования и применение комплекса современных экспериментальных методов, включая проточную

цитометрию, количественную полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией, вестерн-блоттинг, анализ динамического светорассеяния, а также методы высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. Методические подходы, использованные при изучении внеклеточных везикул, реализованы с учетом актуальных международных рекомендаций Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles (MISEV2023). Представленные в диссертации выводы являются логически последовательными, экспериментально обоснованными и соответствуют цели и задачам исследования.

#### **Достоверность полученных результатов и новизна исследования**

Достоверность результатов, полученных в диссертационном исследовании Ключерева Т.О., обеспечивается использованием достаточного количества биологических повторов и адекватного объема выборки, что позволяет получить статистически значимые результаты при применении разнообразных методов анализа.

Новизна исследования заключается в сравнении биологических свойств различных субпопуляций ВВ, полученных из МСК в отношении макрофагов человека, полученных из моноцитов периферической крови. Автор впервые продемонстрировал различия в эффектах ВВ, на различные аспекты функциональной активности макрофагов в отношении продукции активных форм кислорода, фагоцитоза, экспрессии генов и белков, связанных с модуляцией фенотипов макрофагов. Также автором впервые было показано, что МСВ МСК-ПК человека ингибируют активацию M1 макрофагов человека через ослабление передачи сигнала через сигнальный путь JAK-STAT1. Помимо работы в условиях *in vitro*, в ходе данного исследования было впервые проведено сравнение свойств различных ВВ на животной модели остеоартрита.

#### **Значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования Ключерева Т.О., вносят вклад в расширение представления о биологических эффектах ВВ различных субпопуляций, полученных из МСК, в регуляции фенотипической пластичности макрофагов человека. Высокую практическую значимость имеют результаты, полученные в ходе доклинической оценки влияния ВВ на модуляцию воспаления в экспериментальной *in vivo* модели остеоартрита. Полученные данные свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале ВВ. Для дальнейшего внедрения исследуемых в данной работе ВВ в клинические испытания требуется проведение более глубоких и методологически совершенных доклинических исследований с увеличением объема

биологической выборки, расширением панели маркеров, связанных с воспалительными и дегенеративными процессами в тканях суставов, анализом различных временных точек, а также увеличением продолжительности наблюдения.

#### **Соответствие диссертации паспорту специальности**

Диссертация Ключерева Т.О. соответствует паспортам научных специальностей 1.5.3. Молекулярная биология, а именно: пунктам 3, 8, 10 и 1.5.22. Клеточная биология, а именно: пункту 7; 10.

#### **Полнота освещения результатов диссертации в печати**

Результаты диссертационного исследования Ключерева Тимофея Олеговича освещены в 12 работах, включая 5 научных статей в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science и Scopus, а также 7 публикаций типа тезисы в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

#### **Характеристика структуры и содержания диссертации**

Диссертационная работа изложена на 176 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, четыре главы экспериментальных исследований, обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, а также список литературы, включающий 319 источников. Текст диссертации иллюстрирован 35 рисунками и 3 таблицами. Автор обоснована актуальность выбранной темы исследования. В работе сформулированы цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, а также основные выводы, вытекающие из полученных результатов.

Введение содержит обоснование актуальности темы исследования, сформулированные цели и задачи исследования, характеристику научной новизны, теоретической и практической значимости исследования, а также положения, выносимые на защиту. Кроме того, во введении отражено соответствие диссертации паспорту заявленной специальности, обоснован личный вклад автора, приведены сведения о публикациях по теме исследования, а также описаны структура и объем диссертации.

В разделе «Обзор литературы» рассмотрены вопросы, связанные с ролью макрофагов в регуляции иммунного ответа, их происхождением и фенотипическим разнообразием. Проведен анализ литературных данных, касающихся участия макрофагов в патогенезе различных заболеваний, а также описаны основные сигнальные пути, вовлеченные в регуляцию фенотипической пластичности макрофагов. Отдельный раздел обзора посвящен ВВ, их биогенезу и классификации, характеристике МСК как источника

ВВ, а также анализу роли ВВ в регуляции активации макрофагов и обоснованию перспектив их применения в терапии воспалительных заболеваний суставов на примере остеоартрита.

Раздел «Материалы и методы» содержит описание методов, используемых в работе. В исследовании были использованы современные методы, относящиеся к клеточной и молекулярной биологии.

Раздел «Результаты исследования» (главы 3.1 – 3.4) посвящена описанию фактических данных, полученных в ходе исследования.

В главе 3.1 описана характеристика МСК как источника ВВ, а также приведены данные по характеристике МСВ и ВВ/КС, а именно описаны морфология, размеры, экспрессия экзосомальных маркеров, результаты протеомного анализа. Хотелось бы отдельно отметить, что среди методов характеристики ВВ авторы использовали электронную микроскопию. Это делается далеко не всегда, хотя требование проведение такого анализа содержится в большинстве современных протоколов.

В главе 3.2 представлены результаты, характеризующие фенотипические и функциональные свойства макрофагов, дифференцированных из моноцитов человека. В этом разделе приведены результаты анализа влияния ВВ/КС и МСВ МСК-ПК на секреторную активность макрофагов и экспрессию поверхностных рецепторов. Кроме того, в данной главе описаны изменения функциональной активности макрофагов, включая фагоцитарную способность и продукцию активных форм кислорода под влиянием исследуемых ВВ-МСК.

В главе 3.3 представлены данные о регуляции ВВ/КС и МСВ экспрессии генов и белков, являющихся компонентами сигнального пути JAK/STAT1 у M1 макрофагов человека.

Глава 3.4 демонстрирует результаты исследования по анализу влияния ВВ-МСК-ПК человека на развитие воспаления на животной модели остеоартрита.

**Заключительная глава** содержит обсуждение полученных результатов и сопоставлением данных автора с результатами других исследований, представленных в научной литературе. Заключение содержит итоговое обобщение полученных в каждой главе результатов.

**Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации**

Автореферата аккуратно оформлен, его текст отражает содержание диссертации, а также основные положения и выводы диссертационного исследования.

### **Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации**

Диссертационная работа Ключерева Тимофея Олеговича содержит большое количество нового и интересного материала, имеющего как научное значение, так и потенциал для дальнейшего внедрения в практику. Однако работа не лишена недостатков, а некоторые положения вызывают вопросы.

1. Совершенно неудачным представляется термин “жидкофазные ВВ”. В современной русскоязычной литературе достаточно широко используется (хотя и не является общепринятым) термин “жидкофазные конденсаты”, что создает ненужные и неправильные ассоциации. Поиск в литературе также показал, что термин “жидкофазные ВВ” не является общепринятым.

2. В списке сокращений термины приведены не по алфавиту, что создает неудобства для читателей (особенно с учетом того, что автор использует очень большое число сокращений). Удивляет и смешение русскоязычных и англоязычных аббревиатур.

3. В тексте много опечаток и присутствуют крайне неудачные места. В качестве примера приведу несколько примеров: “Данные клетки обладают разнообразными функциями, обеспечивая защиту организма от патогенных микроорганизмов через распознавание (РАМР), а также через собственные антигены, представляющие собой молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMP) через систему консервативных рецепторов, что обеспечивает фагоцитоз и уничтожение патогенов с помощью действия внутриклеточных протеаз и АФК” (стр. 19). “...single cell секвенирования” (стр. 21). “повешенная секреция Ил-10” (стр. 24). “Матриксные везикулы были впервые обнаружены в кальцифицирующих тканях...” (стр. 37). “Данные везикулы выделяются из ткани с помощью ферментов, включающих в себя протеазы, расщепляющие ВКМ. После чего протоколы изолирования ВВ, связанных с ВКМ, аналогичны подходам изолирования жидкофазных ВВ” (стр. 37). “...большее снижение интенсивности окрашивания пятен белков” (стр. 108).

4. Не очень понятно происхождение МСК. В тексте утверждается, что “МСК человека были предоставлены биобанком Института регенеративной медицины”. Сразу после этого утверждения приводятся подробнейшие протоколы получения МСК. В результате происхождение клеток остается загадкой для читателя.

5. Очень плохо проиллюстрированы данные по иммуногистохимии. Во-первых, картинки маленькие и не очень высокого качества. Во-вторых, отсутствует описание морфологии (нет препаратов, окрашенных обзорным красителем). В-третьих, на фотографиях отсутствуют какие-либо указания на обсуждаемые структуры. В целом, такое качество иллюстративного материала не соответствует современным трендам в представлении патологических данных.

6. В ходе выделения МСВ проводилась протеазная обработка. Не могла ли она влиять на результат? Утверждается, например, что “ВВ/КС в отличие от МСВ содержат белки, положительно регулирующие организацию ВКМ”. В списке есть коллаген. Не может ли это быть связано с обработкой коллагеназой?

7. Не понятно описание метода ПЦР *in situ*. При описании метода сказано следующее: “После извлечения антигена образцы обрабатывали 2 мг/мл пепсина в 10 мМ растворе соляной кислоты. Амплификацию геномной ДНК проводили на амплификаторе для ПЦР *in situ*”. При описании результатов: “Был проведен качественный анализ оценки экспрессии инфламмосомы NLRP3 методом ПЦР *in situ*, который позволяет амплифицировать молекулы ДНК в клетках тканей, позволяя качественно детектировать клетки, где происходит транскрипция данного гена.” Не очень понятно, зачем проводить “извлечение антигена” и что это такое, а также как амплификация геномной ДНК может помочь в детекции транскрипции гена.

Тем не менее, диссертационное исследование выполнено на высоком методическом уровне, все высказанные соображения имеют частный характер (подготовка текста и иллюстративного материала), не влияющий на общую оценку работы, принципиальных замечаний по содержанию и оформлению работы не имеется.

#### **Заключение**

Диссертационная работа Ключерева Тимофея Олеговича «Регуляция экспрессии белков и генов, связанных с провоспалительной поляризацией макрофагов, под действием внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а полученные результаты имеют существенное значение для развития молекулярной и клеточной биологии, 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 29.08.2023 г., приказом №0787/Р от 24.05.2024 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Ключевев Тимофей Олегович заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальностям 1.5.3. Молекулярная биология, 1.5.22. Клеточная биология.

**Официальный оппонент:**

Доктор биологических наук (03.03.04. Клеточная биология, цитология, гистология),  
заведующий лабораторией ультраструктуры клеточного ядра  
Научно-исследовательского института физико-химической биологии  
имени А.Н. Белозерского  
Федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения  
высшего профессионального образования  
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Э.Ш. Шеваль Евгений Валерьевич

Подпись Шеваля Евгения Валерьевича заверяю  
И.о. директора  
Научно-исследовательского института  
физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ,  
член-корреспондент РАН



mf Сергиев Петр Владимирович

«23» января 2026 г.

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.  
Белозерского, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.  
Ломоносова»

Адрес: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40

Телефон: +7 (495) 939-53-59

e-mail: fxb@genebee.msu.su