

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Чевкиной Елены Максимовны, 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

Воспалительные процессы лежат в основе патогенеза широкого спектра патологий от дегенеративных поражений суставов до аутоиммунных, нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Макрофаги представляют собой клеточный компонент врожденной иммунной системы, и помимо иммунной защиты, эти клетки участвуют в тканевом гомеостазе и управлении регенеративными процессами. Определенный набор сигнальных молекул может стимулировать формирование провоспалительного (M1) или противовоспалительного (M2) фенотипа макрофагов. Согласно современным представлениям, макрофаги отличаются высокой фенотипической пластичностью со множеством промежуточных фенотипов, баланс которых является необходимым условием поддержания гомеостаза. Избыточная M1 поляризация макрофагов связана с формированием чрезмерного воспаления, приводящего к повреждению тканей, напротив, M2 макрофаги связаны с разрешением воспалительного процесса и стимулируют регенерацию тканей, при этом избыточная дифференциация M2 при злокачественной трансформации клеток может способствовать опухолевой прогрессии и генерализации опухолевого процесса. В этой связи понимание молекулярно-генетических и клеточных механизмов и направленное регулирование данных процессов представляется крайне актуальной задачей. Управление процессом репрограммирования макрофагов в сторону M2 фенотипа представляет собой перспективное направление для терапии широкого спектра заболеваний, связанных с нарушением иммунной регуляции и развитием хронического воспаления.

В последние годы возрастает интерес к бесклеточным подходам, основанным на применении факторов, секретлируемых мезенхимными стромальными клетками (МСК), в частности, внеклеточных везикул (ВВ). Данные микро- и наночастицы способны модулировать иммунные реакции за счет подавления провоспалительной активации и стимуляции сигнальных путей, связанных с формированием M2 фенотипа макрофагов. Это делает ВВ, секретлируемые МСК (ВВ-МСК), перспективными кандидатами для разработки терапевтических подходов с потенциально меньшими рисками по сравнению с клеточной терапией.

Большинство исследований на данный момент сосредоточены на секретлируемых ВВ, присутствующих в кондиционированных средах культивируемых клеток или

выделяемых из различных биологических жидкостей. Относительно недавно появились исследования ВВ, связанных с компонентами внеклеточного матрикса и высвобождающихся при ферментативной обработке тканей или клеток в культурах. Данные ВВ получили название матрикс-связанных везикул (МСВ). В нескольких исследованиях было продемонстрировано, что данные ВВ обладают иммуномодулирующими свойствами, ингибируя провоспалительные сигнальные каскады, благодаря чему стимулируют перепрограммирование макрофагов в сторону М2 фенотипа. На данный момент большая часть работ в этой области сосредоточена на использовании МСВ, выделенных из децеллюлиризованных тканей животных, что ограничивает возможности их экстраполяции на системы, моделирующие физиологию человека. Существенно меньшее количество исследований посвящено МСВ, выделенным из клеточных культур, в том числе из МСК, и отсутствуют работы, в которых сравниваются биологическая активность МСВ и свободно циркулирующих ВВ, полученных из одного и того же типа МСК человека, в отношении макрофагов.

В рамках данного исследования впервые был проведен комплексный анализ воздействия двух типов ВВ: МСВ и везикул, выделенных из секрета (ВВ/КС) МСК пуповины человека (МСК-ПК), на функциональную активность макрофагов человека, дифференцированных из моноцитов. Впервые в рамках одного экспериментального подхода осуществлена сравнительная характеристика протеомного состава МСВ и ВВ/КС, проведена оценка их влияния на поляризацию макрофагов и установлен предполагаемый механизм противовоспалительного действия МСВ на М1-фенотип. Дополнительной значимой составляющей работы является изучение обоих типов ВВ *in vivo*: исследование демонстрирует терапевтический потенциал указанных везикул в экспериментальной модели остеоартрита у крыс. Таким образом, представленные в работе Ключерева Т.О. данные расширяют представления о возможностях применения ВВ-МСК в регуляции воспалительных процессов, подчеркивая значимость МСВ как перспективной терапевтической платформы с выраженной иммуномодулирующей активностью в отношении макрофагов человека.

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

Диссертационная работа Ключерева Т.О. отличается высоким методическим уровнем, убедительностью научной аргументации и обоснованностью сформулированных положений, выводов и практических рекомендаций. Дизайн исследования в целом и последовательность отдельных этапов работы тщательно продуманы и содержат правильную логичную структуру для оптимального решения задач исследования. Представленные положения, выносимые на защиту, подтверждены экспериментальными данными, полученными с использованием современных методических подходов, соответствуют целям и задачам диссертационной работы, что обеспечивает надежность и воспроизводимость полученных результатов.

Достоверность полученных результатов и новизна исследования

Достоверность результатов диссертационного исследования Ключерева Т.О. подтверждается достаточным количеством независимых биологических и технических повторов, наличием всех необходимых контролей, корректным объемом выборки, а также воспроизводимостью данных при использовании различных методов исследования. Применённые методы статистической обработки соответствуют современным требованиям к анализу биомедицинских данных и адекватны поставленным исследовательским задачам. Полученные экспериментальные результаты согласуются с ранее опубликованными работами в данной области, что подтверждает их обоснованность и научную значимость.

Научная новизна исследования определяется выбранными моделями и впервые проведенными исследованиями, посвященными сравнению состава и функционального значения двух типов ВВ, секретируемых МСК – МСВ и ВВ/КС - в отношении фенотипических изменений и функциональной активности макрофагов человека. Впервые проведено сравнение протеомов и биологической активности ВВ-МСК, в том числе иммуномодулирующих эффектов МСВ и ВВ/КС в отношении макрофагов человека, дифференцированных из моноцитов периферической крови. Впервые проведено комплексное сопоставление эффектов двух субпопуляций ВВ в отношении ключевых параметров функциональной активности макрофагов, включая экспрессию воспалительных медиаторов, фагоцитарную активность и продукцию активных форм кислорода.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Диссертационная работа Ключерева Т.О. имеет важное фундаментальное значение, существенно дополняя современные представления о механизмах иммуномодулирующего действия ВВ-МСК. Результаты были получены с использованием макрофагов, дифференцированных из моноцитов периферической крови человека – модели, обладающей высокой биологической релевантностью, но недостаточно охваченной в предыдущих исследованиях. Различия в белковом составе МСВ и ВВ/КС, полученных из клеток основного вещества пупочного канатика (МСК-ПК), выявленные по результатам протеомного анализа, свидетельствует о различиях в их функциональной активности, что подтверждается результатами дальнейшего исследования биологических эффектов данных ВВ на моделях *in vitro* и *in vivo*. Работа охватывает ключевые аспекты активности макрофагов, включая экспрессию и секрецию провоспалительных цитокинов, фагоцитарную активность и продукцию активных форм кислорода. В ходе исследования был выявлен противовоспалительный эффект ВВ МСК-ПК и вероятный механизм, заключающийся в подавлении экспрессии компонентов сигнального пути JAK/STAT1 в M1-поляризованных макрофагах. Важным аспектом работы, имеющим прикладное значение, стало исследование противовоспалительного терапевтического потенциала МСВ и ВВ/КС на *in vivo* модели остеоартрита крыс.

Результаты кандидатской диссертации, полученные Ключеревым Т.О., внедрены в учебный процесс Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Существенным практическим результатом исследования стало экспериментальное подтверждение противовоспалительного действия МСВ и ВВ/КС МСК-ПК на модели остеоартрита крыс, что открывает перспективы разработки новых стратегий бесклеточной терапии воспалительно-дегенеративных заболеваний суставов.

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 отражены в 12 работах, в том числе в трех научных статьях в изданиях, индексируемых в международных базах Scopus, PubMed, двух иных публикациях по результатам исследования, семи публикациях в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 1 зарубежная конференция).

Характеристика структуры и содержания диссертации

Диссертационная работа изложена на 176 страницах и включает все структурные элементы, предусмотренные требованиями к кандидатским диссертациям. Содержание работы представлено следующими разделами: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты исследования (4 главы), Обсуждение, Заключение (включая выводы и практические рекомендации), Перечень используемых сокращений и условных обозначений, а также Список литературы. Библиографический список включает 319 источников (319 – работы зарубежных авторов). Иллюстративный материал представлен 35 рисунками и 3 таблицами.

Введение диссертационной работы содержит обоснование актуальности выбранной научной проблемы, в котором четко сформулированы цель и задачи исследования. В разделе последовательно изложены положения, отражающие научную новизну и практическую значимость выполненной работы. Автором представлены основные положения, выносимые на защиту, подтверждена достоверность и апробация полученных результатов. Также дана характеристика структуры и объема диссертации.

В главе «Обзор литературы» приводится анализ современного состояния проблемы и данных литературных источников о происхождении и фенотипическом разнообразии макрофагов, механизмах регуляции фенотипической пластичности макрофагов, а также их роли в модуляции воспалительного процесса при регенерации повреждения тканей и хронических заболеваниях, связанных с воспалением. Во второй

части главы рассмотрены классификация ВВ, мезенхимные стромальные клетки как источник ВВ, их роль в регуляции функционального состояния макрофагов, а также терапевтический потенциал ВВ-МСК при воспалительных и дегенеративных заболеваниях, в частности остеоартрите.

Во главе «Материалы и методы» содержится подробное описание экспериментальных подходов, использованных в работе. Представлены этапы выделения и характеристики МСК и ВВ, проведение протеомного анализа ВВ-МСК, получение макрофагов из моноцитов периферической крови, а также методы оценки воздействия ВВ-МСК на функциональную активность макрофагов. В работе применялись современные методы молекулярной и клеточной биологии: проточная цитометрия, иммуноцитохимия, количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, иммуноферментный анализ, вестерн-блоттинг, люминол-зависимая хемилюминесценция и др. В рамках *in vivo*-экспериментов описан протокол создания модели остеоартрита у крыс методом менискэктомии, проведен дизайн эксперимента и иммуногистохимическая оценка терапевтического воздействия ВВ-МСК на развитие воспаления в тканях коленного сустава при данном заболевании.

Результаты экспериментальных исследований представлены в главах 3.1–3.6.

В главе 3.1 представлена характеристика МСК и ВВ, а также результаты сравнительного анализа протеомов МСВ и ВВ/КС из основного вещества пупочного канатика (МСК-ПК). Хочется отметить тщательный и продуманный подход к протеомному анализу. Для сравнения использовали по два образца, полученных от 4 здоровых доноров. На первом этапе сравнивали скореллированность между собой образцов одного происхождения (корреляционная матрица, основанная на значениях попарных коэффициентов корреляции Спирмена между образцами), затем применили метод главных компонент для того, чтобы понять, как разделяются образцы по группам МСВ и ВВ/КС. Затем с помощью диаграммы Вена определили 338 белков общих для ВВ/КС и МСВ, 279 – обнаруженных только в ВВ/КС и 111 – только в МСВ. То есть были идентифицированы белки с качественными различиями между группами на уровне – «да/нет». Это очень интересный результат - редкий случай, когда ВВ из одного типа клеток так сильно отличаются по белковому составу! Для этих белков провели анализ обогащения (функциональное аннотирование с помощью базы данных Gene Ontology Biological Proces), который показал, что ВВ/КС, в отличие от МСВ, содержат белки, положительно регулирующие организацию ВКМ. То есть свободно циркулирующие ВВ обогащены компонентами ВКМ (коллагенами, гликопротеинами и протеогликанами, их регуляторами (ферменты ремоделирования ВКМ и регуляторы их сигнальных путей и др.) в отличие от ВВ, которые уже ассоциированы с матриксом. В то же время МСВ, по сравнению с ВВ/КС обогащены белками, участвующими в регуляции функциональной активности макрофагов - фагоцитоза, эндцитоза и др. Отдельно проводили функциональную аннотацию общих для ВВ/КС и МСВ белков, и для них дополнительно провели анализ дифференциальной экспрессии, который выявил 57 белков, дифференциально представленных в ВВ/КС и МСВ, после

чего провели функциональную аннотацию как дифференциально представленных белков, так и белков, уровень которых не имел выраженных различий между группами. Интересно, что и при данном сравнении протеом ВВ/КС более, чем МСВ, обогащен белками, связанными с регуляцией организации ВКМ, в частности, белками коллагеновых фибрилл и др.

Большое внимание уделено автором выбору наиболее эффективной модельной системы. На первом этапе автор определил источник фагоцитов, на которых будет исследован эффект ВВ, для чего сравнили МДМ (макрофаги, дифференцированные из моноцитов периферической крови) и клетки линии моноцитарного лейкоза ТНР-1 в контексте поляризации в М1 и М2 фенотипы. Поскольку МДМ показали более выраженные различия по секреции цитокинов и белковых маркеров (М1 макрофаги больше других фенотипов экспрессировали CD86, а у М2 макрофагов был наибольший уровень экспрессии CD206), то дальнейшее исследование влияния ВВ, а именно, ВВ/КС и МСВ МСК-ПК, на функциональную активность фагоцитов проводили с использованием данной экспериментальной модели. Важно отметить, что автором подтверждено поглощение макрофагами везикул (как ВВ/КС, так и МСВ) с помощью мечения мембранным красителем РКН26. Далее автор столь же внимательно подошел к выбору типа МСК в качестве источника везикул. Для этого был проведен сравнительный анализ влияния как МСВ, так и ВВ/КС, полученных из трех источников - МСК-ПК, жира и десны, культивируемых как в монослойных культурах, так и в виде сфероидов, на модуляцию провоспалительной активности М1 макрофагов, в частности, на продукцию провоспалительного цитокина – фактора некроза опухолей ФНО- α . По данным ИФА снижение секреции ФНО- α М1 макрофагами наблюдалось во всех вариантах коинкубации с ВВ, то есть происхождение МСК и тип культивирования не оказывал значимого влияния на эффект ВВ, в связи с чем дальнейшие исследования проводились на ВВ из МСК-ПК, культивируемых в монослойных (2d) культурах. Автором были подобраны эффективные концентрации ВВ (100 и 300 мкг тотального везикулярного белка на мл среды), при которых наблюдалось выраженное снижение уровня секреции ФНО- α . Хочется отдельно отметить, что автор специально оговаривает, что такой метод оценки концентрации ВВ (пересчет на белок) допустим только в случае исследования ВВ, выделенных из кондиционированной среды клеток, когда контаминация препаратов ВВ протеин-содержащими частицами не-везикулярного происхождения отсутствует или минимальна. Этот факт свидетельствует о глубоком понимании автором методов работы с ВВ, в том числе подходов к их количественному анализу. Также автор подтвердил, что используемые концентрации не оказывали на клетки цитотоксического эффекта (минимальная секреция макрофагами лактатдегидрогеназы). При анализе результатов обращает на себя внимание то, что во всех вариантах источников МСК максимально выраженный эффект на продукцию ФНО- α наблюдался при инкубации макрофагов с МСВ.

Глава 3.2 посвящена исследованию влияния ВВ-МСК-ПК на экспрессию и секрецию воспалительных цитокинов; экспрессию поверхностных рецепторов,

фагоцитарную активность и продукцию активных форм кислорода макрофагами, дифференцированными из моноцитов человека. На первом этапе было проведено исследование влияния обоих типов ВВ МСК-ПК (МСВ и ВВ/КС) на экспрессию (методом кПЦР-ОТ) и секрецию (методом ИФА) провоспалительных цитокинов у МДМ различных фенотипов. Результаты в целом показали, что оба типа ВВ изменяют фенотип М1 макрофагов в сторону снижения продукции провоспалительных цитокинов (иммунодепрессивный эффект). Далее был проведен анализ влияния ВВ на экспрессию поверхностных рецепторов - маркеров поляризации макрофагов (CD86 – маркера М1 поляризации и CD206 – маркера М2 поляризации) у МДМ различных фенотипов (M0_ГМ, М1, M0_М, М2) (методами кПЦР-ОТ, ИЦХ и проточной цитометрии). Несмотря на некоторую противоречивость данных анализа экспрессии и продукции белков в случае отдельных фенотипов макрофагов, можно сказать что наблюдалось выраженное снижение экспрессии CD86, а также усиление экспрессии CD206 у М1 макрофагов, причем, как и в случае с ФНО- α , МСВ оказали более значимый эффект по сравнению с ВВ/КС. Таким образом, автором показан важный феномен - сдвиг фенотипа М1 макрофагов под действием ВВ МСК в сторону М2-подобных макрофагов, причем более выраженный - в случае МСВ. При этом в отношении М2 макрофагов МСВ МСК-ПК способствовали некоторому усилению секреции ФНО- α и Ил-6, а также незначительному снижению экспрессии рецептора CD206, что свидетельствует о некотором провоспалительном эффекте в отношении макрофагов данного фенотипа.

Далее проведено исследование влияния ВВ МСК-ПК на способность макрофагов к фагоцитозу бактерий *E.Coli* и продукции активных форм кислорода (АФК). При сравнении нативных макрофагов, наименьшей способностью к фагоцитозу обладали МДМ фенотипа М1 и M0_ГМ, а наибольшей - фенотипа М2 и M0_М. Аналогичная картина наблюдалась и при анализе АФК: наибольшей радикал-генерирующей активностью (люминол-зависимая хемилюминисценция) характеризовались М1 макрофаги, наименьшей - М2. Под воздействием везикул МСК-ПК обоих типов (ВВ/КС и МСВ) выявлено усиление фагоцитоза у макрофагов M0_ГМ, М1 фенотипов, при этом фагоцитарную активность фенотипов M0_М и М2 не менялась или даже снижалась (в случае МСВ). Аналогично, ВВ из МСК-ПК ослабляли продукцию АФК у М1 макрофагов, однако в данном случае выраженное снижение наблюдалось только после воздействия на клетки ВВ/КС. Для выяснения механизмов влияния ВВ на продукцию АФК макрофагами М1 был проведен анализ экспрессии белка НАДФН-оксидазы 2 и ее субъединиц p47phox и p67phox, который показал снижение экспрессии под воздействием ВВ как на уровне мРНК, так и белковой продукции отдельных субъединиц у М1 макрофагов. Важно, что значимое снижение продукции АФК и экспрессии НАДФН-оксидазы 2 наблюдалось под воздействием ВВ/КС, но не МСВ, что во-первых, свидетельствует в пользу НАДФН-2-зависимого механизма модуляции АФК, а во вторых, подчеркивает разницу в активности ВВ/КС и МСВ в отношении М1 макрофагов – первые ослабляют продукцию АФК, а МСВ

в большей степени снижают секрецию ФНО- α и экспрессию CD86 маркера M1-поляризации.

В целом, данные результаты, как и результаты предыдущего раздела, свидетельствуют о ВВ-зависимых изменениях M1 макрофагов в сторону противовоспалительного фенотипа – усиление фагоцитоза, ослабление продукции АФК, вероятно по НАДФ-2 -зависимому механизму, снижение продукции воспалительных цитокинов и экспрессии поверхностных рецепторов - маркеров M1 поляризации.

В главе 3.3 для определения возможного механизма выявленных эффектов ВВ-МСК-ПК автором исследовано влияние везикул на экспрессию генов и белков сигнального пути JAK/STAT1, регулирующих процессы поляризации макрофагов. В частности, был проведен анализ экспрессии транскрипционных факторов IRF5, IRF9 (факторы регуляции интерферона), STAT1, STAT2, связанных с провоспалительной M1 поляризацией, а также STAT3, STAT6 и IRF4, ассоциированных с M2 противовоспалительной поляризацией макрофагов. Автором обнаружено ВВ-зависимое снижение экспрессии у M1 макрофагов провоспалительных молекул STAT1, STAT2, IRF9 как на уровне транскрипции, так и продукции белков, причем существенно более выраженное - в случае воздействия МСВ.

Глава 3.4 посвящена исследованию противовоспалительной активности ВВ-МСК-ПК *in vivo* на модели остеоартрита (ОА) крыс, стимулированного менискэктомией коленного сустава. В образцах экспериментальных животных (внутриартикулярная инъекция ВВ в концентрации 300 мкг/мл) и контрольных животных проведен ИГХ анализ маркеров, ассоциированных с воспалением при ОА, включая ФНО- α и iNOS, а также аргиназу-1, и рассчитан индекс представленности данных белков в баллах (composite score) с учетом интенсивности и распространенности окрашивания в синовиальной, костно-хрящевой и жировой тканях суставов. Исследование показало значимый противовоспалительный эффект обоих типов ВВ, максимально выраженный в случае ВВ/КС, что свидетельствует о терапевтическом потенциале ВВ МСК. Этот вывод был далее подтвержден при исследовании маркера прогрессирования ОА, NOD-подобного рецептора типа 3 (NLRP3) методом ПЦР *in situ* в тех же образцах экспериментальных животных. В группе, получавшей терапию ВВ/КС, наблюдалось снижение уровня экспрессии NLRP3, причем, как и в предыдущем исследовании, – максимально выраженный эффект наблюдался в группе животных, получавших терапию ВВ/КС. Таким образом, по результатам исследования показаны не только фенотипические изменения и сдвиг в сторону противовоспалительной активности макрофагов M1 под действием ВВ-МСК, но и выраженный терапевтический противовоспалительный эффект ВВ, секретлируемых МСК, что делает их перспективным инструментом для терапии ОА.

В четвертой главе «Обсуждение» был проведен анализ полученных данных, их возможная интерпретация и сопоставление с современными литературными данными, свидетельствующее о глубоком понимании автором современного состояния проблемы исследования и прекрасном владении литературными источниками.

Раздел Заключение содержит обобщение ключевых результатов диссертационного исследования, подтверждающих достижение поставленной цели. На основании полученных данных сформулированы пять выводов, отражающих все основные результаты исследования и полностью соответствующие сформулированным задачам. Также сформулированы практические рекомендации (3 пункта), имеющие важное значение для дальнейших исследований иммуномодулирующей активности ВВ мультипотентных МСК-ПК в отношении макрофагов.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями, отражает логику и последовательность решения задач исследования, раскрывает основные положения, выносимые на защиту.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертационная работа Ключерева Тимофея Олеговича представляет собой объемное исследование, посвященное оценке влияния ВВ-МСК на различные аспекты функциональной активности макрофагов человека, а также на экспрессию генов и белков, вовлеченных в провоспалительную активацию этих клеток. Хочется отметить высокий методический уровень исследования и уровень доказательности результатов, большое внимание и тщательное отношение к выбору экспериментальных моделей и методов исследования, а также логику и последовательность в дизайне экспериментов и изложении результатов. Среди других достоинств данной работы необходимо отметить аккуратность в анализе и интерпретации данных. Отдельно необходимо отметить анализ терапевтического потенциала МСВ и ВВ/КС МСК-ПК в условиях *in vivo* на модели остеоартрита у крыс, который определил практическую направленность и прикладную значимость полученных результатов.

К замечаниям по диссертационной работе можно отнести несколько неудачных формулировок:

1) «Микровезикулы представляют собой **мембраносвязанные везикулы**, высвобождающиеся путем отпочковывания мембраны». Мембрано-связанным можно считать происхождение микровезикул, которое действительно осуществляется путем непосредственного отпочкования от плазматической мембраны, однако сами везикулы не остаются связанными с мембранами.

2) «ТНР-1 макрофаги отличаются по своему **транскриптомному профилю функциональной активности** от человеческих макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови». Вероятно, имеет место потеря союза, которая привела к искажению смысла предложения, и следует читать: отличаются по своему транскриптомному профилю и функциональной активности.

3) «Экзосомы можно дифференцировать от других типов ВВ с помощью эндосомальных маркеров CD9, CD63, CD81, TSG101» - данное утверждение как минимум спорно, и в настоящее время имеется множество данных, указывающих на то, что все указанные белки широко представлены не только в экзосомах, но и в везикулах другого происхождения (прежде всего микровезикулах). Действительно, в литературе долгое время было принято называть эти маркеры экзосомальными, и представленные автором ссылки (214, 215) скорее отражают устаревшую терминологию.

4). При описании результатов анализа морфологии частиц методом просвечивающей электронной микроскопии, автор указывает, что МСВ и ВВ/КС имеют характерную **чашеобразную округлую морфологию**. Такая морфология не является природной, а отражает изменения, возникающие при нанесении везикул на сетку при пробоподготовке в данном методе исследования. Следует уточнить, что «характерность» относится к данному типу анализа, а не к нативной структуре везикул.

В качестве дискуссионного вопроса можно указать следующий момент: автор употребляет термин фагоцитоз применительно к показанному им захвату макрофагами ВВ МСК. Является ли в действительности фагоцитоз основным механизмом интернализации ВВ или имеют место другие пути поглощения ВВ, прежде всего различные типы эндоцитоза? И какой из этих путей преобладает? Это вопрос может быть принципиальным в фундаментальном аспекте, поскольку согласно современным представлениям, фагоцитоз и последующее формирование фагосом приводит к деградации захваченных фрагментов, в том числе и ВВ. Поскольку в данной работе мы видим выраженный фенотипический и функциональный эффект ВВ – вероятно речь может идти скорее об эндоцитозе? Также вероятно нельзя исключить и закоревание ВВ на мембранах макрофагов и взаимодействие по лиганд-рецепторному пути? В данном контексте можно даже предположить, что выявленные различия между ВВ/КС и МСВ могут объясняться в том числе различными способами взаимодействия данных типов ВВ с макрофагами.

Вышеуказанные замечания носят уточняющий характер и не снижают научную ценность диссертации. Заданные вопросы направлены на обсуждение потенциальных направлений для дальнейшего развития фундаментальных и прикладных исследований в данном научном направлении.

Заключение


Таким образом, диссертационная работа Ключерева Тимофея Олеговича на тему: «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, является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором автором решен ряд задач в области молекулярной и клеточной биологии, в частности, в области исследования иммуномоделирующей активности внеклеточных везикул полипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Существенным вкладом является демонстрация

способности ВВ-МСК ослаблять воспалительный процесс в тканях коленных суставов в рамках животной модели остеоартрита, что подчеркивает потенциальную значимость полученных результатов для развития противовоспалительных и регенеративных терапевтических подходов. Работа полностью 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 кандидата биологических наук по специальностям 1.5.3. Молекулярная биология, 1.5.22. Клеточная биология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук (3.1.6. Онкология, лучевая терапия (ранее 14.01.12 - Онкология)),

Заведующая лабораторией внутриклеточной и межклеточной сигнализации научно-исследовательского института Экспериментальной онкологии и канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России,



Чевкина Елена Максимовна

Подпись Чевкиной Елены Максимовны заверяю

Ученый секретарь, к.м.н.



Кубасова Ирина Юрьевна

«06» 07 2026г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России

Адрес: 115522, г. Москва, Каширское шоссе 24

Телефон: +7 (499) 612-89-19

e-mail: info@ronc.ru, сайт: <https://www.ronc.ru/>