

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор Федерального
государственного бюджетного
образовательного учреждения

высшего образования «Московский
государственный университет имени
М.В.Ломоносова»

д.ф.-м.н., профессор РАН,
А.А. Федянин

«05» октября 2023 года



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.
Ломоносова»

Диссертационная работа «Клеточные пласты из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток как платформа для тканевой инженерии в регенеративной медицине» выполнена в Институте регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра и на Факультете фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова».

В период выполнения диссертации соискатель Макаревич Павел Игоревич работал в должности врача-терапевта, старшего научного сотрудника, а затем заведующего лабораторией генно-клеточной терапии в Институте регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова». С 2018 года по совместительству является доцентом Кафедры биохимии и регенеративной медицины Факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного

учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова».

Макаревич Павел Игоревич в 2008 году окончил с отличием Факультет фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» с присуждением квалификации «Врач» по специальности «Лечебное дело» (диплом ВСА 0702066 от 30.06.2008).

В 2015 году в диссертационном совете Д 208.016.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации защитил диссертацию на тему «Разработка метода комбинированной генной терапии ишемических заболеваний с использованием плазмидных конструкций с генами VEGF165 и HGF человека» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.01.05 – кардиология и 03.01.04 – биохимия (07 октября 2015 года, протокол № 10). Диплом кандидата медицинских наук сер. КНД, №017203. выдан на основании Приказа Минобрнауки № 39/нк-9 от 27.01.2016.

Научный консультант

Ткачук Всеволод Арсеньевич, доктор биологических наук, профессор, академик РАН, декан Факультета фундаментальной медицины, заведующий Кафедрой биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины, директор Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова».

Работа выполнялась в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего

образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» по теме «Поиск мишеней, создание инновационных препаратов и тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины» (2015-2017 гг.), № государственной регистрации 121061800164-2; гранта Российского фонда фундаментальных исследований №18-315-20053 «Выяснение физиологических механизмов регуляции дифференцировки постнатальных стволовых клеток в модельной нише» (2019-2020 гг.); грантов Российского научного фонда №19-75-00067 «Общие и тканеспецифичные свойства стромальных клеток при репаративной регенерации» (2020-2021 гг.) и №19-75-30007 «Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека» (2019 г.-н.в.); грантов Фонда президентских грантов №МК-1068.2019.7 «Выяснение тканеспецифичных механизмов взаимодействия клеток эндотелия и перицитов» (2019-2020 гг.) и №14.W01.17.2422-МК «Разработка инновационного биоматериала на основе бесклеточного матрикса, производимого мезенхимными стромальными клетками человека, для стимуляции регенеративных процессов» (2017-2018 гг.).

Тема диссертационного исследования «Клеточные пласты из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток как платформа для тканевой инженерии в регенеративной медицине» утверждена на заседании Ученого совета Медицинского научно-образовательного центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (14.04.2022, протокол № 2).

Диссертационная работа П.И. Макаревича «Клеточные пласты из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток как платформа для тканевой инженерии в регенеративной медицине» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.14 – Трансплантология и искусственные органы была обсуждена на совместном заседании коллектива Института регенеративной медицины, Научно-технического совета и Ученого совета Медицинского научно-образовательного центра Федерального

государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (протокол № 1 от 18.10.2023г.).

По итогам обсуждения диссертационной работы принято следующее заключение

Диссертационная работа П.И. Макаревича является самостоятельной и завершенной научно-квалификационной работой, которая посвящена экспериментальной разработке и обоснованию применения минимальных тканеинженерных конструкций в виде клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток в регенеративной медицине. Ее тематика и содержание соответствует научной специальности 3.1.14 - Трансплантология и искусственные органы (пункты 1, 4 и 5 паспорта научной специальности) и направлена на создание перспективной платформы на основе методов тканевой инженерии, а также выяснение механизмов действия тканеинженерных конструкций, которые могут быть использованы в регенеративной медицине, трансплантологии и хирургии. Работа носит научно-прикладной характер.

В рамках диссертационной работы соискателем решена фундаментальная проблема современной регенеративной медицины, заключающаяся в недостаточной эффективности клеточной терапии с введением стволовых клеток взрослого организма. В качестве решения им предложен и экспериментально обоснован переход к использованию методов тканевой инженерии, причем выбран наиболее гибкий и минимально затратный подход с применением конструкций в виде клеточных пластов.

Актуальность проблемы

Клеточная терапия с использованием мезенхимных стромальных клеток из различных источников, начиная с 1990-х годов стала одним из наиболее активно развивающихся направлений регенеративной медицины. При этом клинические исследования поздних фаз зачастую продемонстрировали ее

недостаточно высокую эффективность, в значительной степени связанную с гибелью клеточного материала при его суспензионном введении в поврежденные ткани и органы.

Среди перспективных решений данной проблемы значительное внимание привлекли методы тканевой инженерии, основной целью которой является не просто доставка клеточного материала, а его организация в тканеподобную структуру, формируемую *ex vivo* с дальнейшей трансплантацией в организм реципиента. Среди технологий тканевой инженерии высокий трансляционный и практический потенциал продемонстрировали т.н. «клеточные пласты» (англ. *cell sheets*). Эти минимальные тканеинженерные конструкции, состоящие из живых клеток и наработанного ими в культуре внеклеточного матрикса, оказались недороги и просты в получении и при этом обладают целым рядом преимуществ перед введением клеток в суспензии. Клеточные пласты из мезенхимных стромальных клеток получили распространение в качестве инструмента доставки, который значительно повышает их выживаемость за счет наличия в их составе внеклеточного матрикса, обеспечивающего клеткам необходимые сигналы о связи с тканью и ее элементами.

К настоящему времени в отрасли в тканевой инженерии сложилась ситуация, в которой данный подход может получить развитие в качестве отдельного платформенного решения для регенеративной медицины. Ее основой является получение и трансплантация клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток с возможностью их генетической модификации с целью повышения регенераторного потенциала с учетом показаний. При этом зачастую в понимании механизмов, определяющих эффекты данного типа тканеинженерных конструкций, имеются существенные пробелы. Также достаточно поверхностно оказались изученными и механизмы, отвечающие за самоорганизацию мезенхимных стромальных клеток в культуре, которая лежит в основе получения пластов из них.

Перечисленные факторы являются сдерживающими развитие перспективной области регенеративной медицины и трансляционные

исследования по созданию новых тканеинженерных продуктов. В связи с изложенным можно сделать заключение об актуальности выбранного направления исследований и его значимости для развития всей отрасли в целом.

Личное участие соискателя

Личный вклад П.И. Макаревича заключается в постановке цели, формулировке задач и методологии исследования, а также в разработке и оптимизации протоколов получения и открепления клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека и животных. В рамках оценки эффективности клеточных пластов как средства терапевтического ангиогенеза автором лично отработаны методы амплификации бакуловирусных векторов и их использования для трансдукции клеточных пластов. Автор принимал участие в проведении экспериментов на животных, им были разработаны подходы к оценке выживаемости трансплантированных клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток и проведены соответствующие эксперименты на животных. Им выполнены статистическая обработка первичных данных, обобщение и анализ результатов работы в целом.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Достоверность полученных результатов обеспечивается четкой постановкой задач в соответствии с целью исследования, использованием современных лабораторных методов с последующей корректной статистической обработкой первичных данных. Получение достоверных результатов обеспечивается методологически корректным дизайном экспериментов, а на этапе анализа – критической оценкой выводов и сопоставлением результатов исследований с современным уровнем знаний в данной области науки. Выводы сделаны на основании достоверных результатов, представленных в работе, и отвечают

поставленной цели и задачам. Положения, выносимые на защиту, сформулированы конкретно и научно обоснованы.

Научная новизна и теоретическая значимость исследования

В основу диссертации положен цикл экспериментальных работ, посвященных одному из ключевых направлений современной регенеративной медицины – тканевой инженерии, с развитием которой в перспективе связывают решение ряда задач основополагающей медицинской дисциплины – трансплантологии.

В работе с использованием нескольких животных моделей убедительно показана высокая регенераторная эффективность клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток, а также методов генетической модификации конструкций с целью повышения их паракринной активности. В работе впервые сформулирована концепция триггерного действия мезенхимных стромальных клеток в составе клеточных пластов. Его основной принцип - кратковременное паракринное воздействие, достаточное для изменения исхода заживления вплоть до полной регенерации без признаков фиброзирования.

Также в работе установлен и изучен феномен структурной и функциональной гетерогенности тканеинженерных конструкций в виде пластов из мезенхимных стромальных клеток. Впервые установлен факт коммитирования мезенхимных стромальных клеток в составе клеточных пластов в остео- и хондрогенном направлениях с установлением вклада конденсации клеток в культуре в данный процесс. В работе проведен транскриптомный анализ, показавший выраженные изменения экспрессии генов при конденсации клеточной массы в толще пласта, а также установлена роль малых Rho-ГТФаз в регуляции процесса коммитирования мезенхимных стромальных клеток в остео- и хондрогенном направлениях, а также в подавлении их адипогенной дифференцировки.

Практическая значимость работы

В работе представлено комплексное экспериментальное обоснование использования клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Помимо оптимизации протоколов сборки конструкций и их децеллюляризации исследовано влияние свойств донора и культуральных характеристик клеток на время, необходимое для получения готового клеточного пласта. В качестве способа его прогнозирования предложено опираться на установленную в работе корреляцию продолжительности сборки клеточных пластов с длительностью культуральной лаг-фазы.

На моделях *in vivo* обосновано использование клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани как основы гибкой платформы для тканевой инженерии в регенеративной медицине. Показано их преимущество перед введением клеточного материала в суспензии при стимуляции заживления дефектов мягких тканей и как средства терапевтического ангиогенеза. Впервые показана возможность регенерации кожи без образования рубца в исходе заживления пролежня при условии трансплантации на его поверхность клеточного пласта из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани. Также проведено подробное исследование состава секрета пластов и обнаружено увеличение представленности факторов роста и цитокинов, опосредующих стабилизацию кровеносных сосудов в толще грануляционной ткани. В работе впервые показана важность паракринной регуляции ангиогенного ответа в грануляционной ткани после трансплантации клеточных пластов как основы регенерации дермы без образования рубца.

Впервые предложено и экспериментально обосновано использование клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани как средства терапевтического ангиогенеза при ишемии нижней конечности. Также показана возможность модификации клеточных пластов бакуловирусным вектором для увеличения их ангиогенной эффективности и восстановления кровоснабжения ишемизированных тканей. Предложенный протокол быстрой (в

течение 6 часов) бакуловирусной трансдукции, позволяет получать клеточные пласты с обогащением их секретом фактором роста VEGF165. В эксперименте *in vivo* установлено, что такая модификация конструкций позволяет усилить их ангиогенное действие по сравнению с немодифицированными клеточными пластами.

Полученные данные позволяют перейти к проведению доклинических исследований надлежащего объема с целью дальнейшего внедрения тканеинженерных клеточных продуктов в медицинскую практику по соответствующим показаниям.

Научная зрелость соискателя

Соискателем опубликовано более 70 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в базы Web of Science и Scopus, индекс Хирша = 14 (Web of Science); 15 (Scopus).

Исследования Макаревича П.И. были поддержаны грантами Президента РФ, Фондом перспективных исследований, Российского фонда фундаментальных исследований, Российского научного фонда и Минобрнауки РФ. Под руководством и со-руководством Макаревича П.И. защищены четыре кандидатские диссертации.

В 2019 году П.И. Макаревич отмечен Премией правительства Москвы молодым ученым «за цикл работ, посвященных актуальным проблемам регенеративной медицины».

Научная ценность выполненной соискателем работы и соответствие требованиям к диссертации

Диссертационное исследование Макаревича П.И. вносит важный вклад в решение проблемы повышения эффективности современных подходов регенеративной медицины, а также обосновывает использование клеточных пластов из МСК в качестве перспективной тканеинженерной платформы по широкому спектру показаний.

Содержание диссертационной работы П.И. Макаревича соответствует требованиям п.9 "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в редакции с актуальными изменениями на 26 октября 2023 г.); п.16 «Положения о присуждении ученых степеней в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, утвержденного приказом директора от 12.02.2021 №70/8, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук.

Работа П.И. Макаревича соответствует требованиям, установленным п.14 "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в редакции с актуальными изменениями на 26 октября 2023 г.); п.20 «Положения о присуждении ученых степеней в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, утвержденного приказом директора от 12.02.2021 №70/8, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

Результаты диссертационной работы внедрены в работу Института регенеративной медицины, отдела клинической патологии и отдела гинекологии и репродуктивной медицины Медицинского научно-образовательного центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова». Основные положения диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры биохимии и регенеративной медицины Факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский

государственный университет имени М. В. Ломоносова» с декабря 2021 года, о чем имеется соответствующий акт внедрения.

Основные положения и результаты диссертации были доложены и обсуждены на III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 15-18 ноября 2017 г.), IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 20-23 ноября 2019 г.); V Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 23-25 ноября 2022 г.), конференции «StemCellBio-2018: Фундаментальная наука как основа трансляционной медицины» (Санкт-Петербург, 15-17 ноября 2018 г.), Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий» (Санкт-Петербург, 8-11 октября 2019 г.), всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, 24-28 июля 2022 г.), конференциях азиатско-тихоокеанского отделения Международного общества тканевой инженерии и регенеративной медицины (TERMIS-AP) (Тайбэй, Тайвань, 3-6 сентября 2016 г.; Чеджу, Ю. Корея, 5-8 октября 2022 г.) и XXVI Конгрессе Европейского общества генной и клеточной терапии (ESGCT) (Лозанна, Швейцария, 16-19 октября 2018 г.).

Материалы диссертации полностью изложены в 25 статьях в ведущих рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, из которых 8 входят в Перечень рецензируемых научных изданий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России. Получено 2 патента РФ на изобретение.

Основные статьи по теме диссертации, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации:

1. **P. I. Makarevich**, M. A. Boldyreva, E. V. Gluhanyuk et al. Enhanced angiogenesis in ischemic skeletal muscle after transplantation of cell sheets from baculovirus-transduced adipose-derived stromal cells expressing VEGF165. *Stem Cell Res Ther.* 2015. V. 6. P. 204.
2. E. S. Zubkova, I. B. Beloglazova, **P. I. Makarevich** et al. Regulation of Adipose Tissue Stem Cells Angiogenic Potential by Tumor Necrosis Factor-Alpha. *J Cell Biochem.* 2016. V. 117. P. 180-196.
3. K. V. Dergilev, **P. I. Makarevich**, Z. I. Tsokolaeva et al. Comparison of cardiac stem cell sheets detached by Versene solution and from thermoresponsive dishes reveals similar properties of constructs. *Tissue Cell.* 2017. V. 49. P. 64-71.
4. M.N. Hsu, H.T. Liao, K.C. Li, H.H. Chen, T.C. Yen, **P. Makarevich**, Y. Parfyonova, Y.C. Hu. Adipose-derived stem cell sheets functionalized by hybrid baculovirus for prolonged GDNF expression and improved nerve regeneration. *Biomaterials.* 2017. V. 140. P. 189-200.
5. N.A. Aleksandrushkina, N.V. Danilova, O.A. Grigorieva, P.G. Mal'kov, V.S. Popov, A.Y. Efimenko, **P.I. Makarevich**. Cell Sheets of Mesenchymal Stromal Cells Effectively Stimulate Healing of Deep Soft Tissue Defects. *Bull Exp Biol Med.* 2019. V. 167. P. 159-163.
6. M.A. Boldyreva, E.K. Shevchenko, Y.D. Molokotina, **P.I. Makarevich** et al. Transplantation of Adipose Stromal Cell Sheet Producing Hepatocyte Growth Factor Induces Pleiotropic Effect in Ischemic Skeletal Muscle. *Int J Mol Sci.* 2019. V. 20. P.3088.
7. P.P. Nimiritsky, R.Y. Eremichev, N.A. Alexandrushkina, A.Y. Efimenko, V.A. Tkachuk, **P.I. Makarevich**. Unveiling Mesenchymal Stromal Cells' Organizing Function in Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2019. V. 20. P. 823.
8. N. Alexandrushkina, P. Nimiritsky, R. Eremichev, V. Popov, M. Arbatskiy, N. Danilova, P. Malkov, Z. Akopyan, V. Tkachuk, **P. Makarevich**. Cell Sheets from Adipose Tissue MSC Induce Healing of Pressure Ulcer and Prevent Fibrosis via Trigger Effects on Granulation Tissue Growth and Vascularization. *Int J Mol Sci.* 2020. V. 21. P. 55567.

9. **П.И. Макаревич**, А.Ю. Ефименко, В.А. Ткачук. Биохимическая регуляция регенеративных процессов факторами роста и цитокинами: основные механизмы и значимость для регенеративной медицины. Биохимия. 2020. Т. 85. С. 15-33.

10. P. Nimiritsky, E. Novoseletskaaya, R. Eremichev, N. Alexandrushkina, M. Karagyaour, O. Vetrovoy, N. Basalova, A. Khrustaleva, A. Tyakht, A. Efimenko, V. Tkachuk, **P. Makarevich**. Self-Organization Provides Cell Fate Commitment in MSC Sheet Condensed Areas via ROCK-Dependent Mechanism. Biomedicines. 2021. V. 9. P. 1192.

Патенты РФ на изобретение:

1. Патент РФ №2718907, 15 апреля 2020 г. Биоматериал на основе бесклеточного матрикса, производимого мезенхимными стромальными клетками человека, способ его получения и способ применения для стимуляции регенеративных процессов

2. Патент РФ №2636464, 23 ноября 2017 г. Способ получения и использования тканеинженерных конструкций на основе прогениторных клеток для лечения заболеваний сердца

Диссертационная работа «Клеточные пласты из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток как платформа для тканевой инженерии в регенеративной медицине» Макаревича Павла Игоревича рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.14 - Трансплантология и искусственные органы.

Диссертационная работа обсуждена и Заключение принято на совместном заседании научного коллектива Института регенеративной медицины, Научно-технического совета и Ученого совета Медицинского научно-образовательного центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (Протокол № 1 от 18.10.2023).

Присутствовало на заседании 25 чел.

Результаты голосования: «за» – 25 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел.

Председательствующий на заседании:

Директор

Медицинского научно-образовательного центра

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования

«Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

академик РАН, доктор медицинских наук,

профессор


А.А. Камалов

Подпись Камалова Армаиса Альбертовича заверяю

Ученый секретарь

Медицинского научно-образовательного центра

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования

«Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

доктор медицинских наук



Я. А. Орлова