

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.023.01, СОЗДАННОГО  
НА БАЗЕ Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Государственного научного центра Российской Федерации - Института медико-  
биологических наук Российской академии наук, Министерство науки и высшего  
образования Российской Федерации  
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 26.04.2024 г. № 14

О присуждении Ефименко Анастасии Юрьевне, гражданке Российской Федерации,  
ученой степени доктора медицинских наук.

Диссертация в виде научного доклада «Роль мезенхимных стромальных клеток в регуляции ниш тканеспецифичных стволовых клеток» по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных принята к защите 26.01.2024 г. (протокол №1) диссертационным советом 24.1.023.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации - Института медико-биологических наук Российской академии наук, Министерство науки и высшего образования Российской Федерации (ГНЦ РФ – ИМБП РАН), 123007, г. Москва, Хорошевское шоссе, д.76А, приказ №937-592 от 16.05.2008 г., приказ о частичном изменении состава №1577/НК от 16.12.2016 г.

Соискатель - Ефименко Анастасия Юрьевна, 23 марта 1983 года рождения, в 2006 году окончила факультет фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» с отличием, в 2011 году – аспирантуру факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности «биохимия», в 2011-2013 годах прошла клиническую ординатуру факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности «терапия».

Диссертацию «Влияние возраста на ангиогенные свойства мезенхимальных стволовых жировой ткани» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 03.01.04 - Биохимия и 14.01.05 – Кардиология, Ефименко А.Ю. защитила в 2011 году в диссертационном совете Д 212.203.13, созданном на базе Федерального государственного автономного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов». Диплом кандидата медицинских наук сер. ДКН, №154797 выдан на основании Приказа Минобрнауки от 05.04.2012 № 84/нк-1.

В период подготовки диссертации соискатель работала в ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова в должности сначала врача-терапевта, затем старшего научного сотрудника, а с 2018 года заведующей лабораторией репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра и доцента кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины, где работает и в настоящее время.

Диссертация в виде научного доклада выполнена в Институте регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова), Министерство науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный консультант - доктор биологических наук, профессор, академик РАН Ткачук Всеволод Арсеньевич, декан факультета фундаментальной медицины, заведующий кафедрой биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины, директор Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова.

Официальные оппоненты:

1. Ашрафян Левон Андреевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заместитель директора ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова», директор Института онкогинекологии и маммологии

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова»,

2. Литвинова Лариса Сергеевна, доктор медицинских наук, доцент, директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»,

3. Ельчанинов Андрей Владимирович, доктор медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией роста и развития Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ "Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации – представила положительное заключение. Заключение составлено Галагудза Михаилом Михайловичем, доктором медицинских наук, профессором, член-корреспондентом РАН, директором Института экспериментальной медицины, заведующим кафедрой патологической физиологии Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова». Утверждено Конради Александрой Олеговной, доктором медицинских наук, профессором, академиком РАН, заместителем генерального директора по научной работе ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова».

В заключении указано, что диссертационная работа в виде научного доклада «Роль мезенхимных стромальных клеток в регуляции ниш тканеспецифичных стволовых клеток» Ефименко А.Ю., представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных, является целостной и завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, раскрывающие физиологические механизмы участия МСК в регуляции ниш тканеспецифичных стволовых клеток за счет действия компонентов их секретома, что позволило предложить новый подход к разработке биологического лекарственного препарата для лечения тяжелых нарушений сперматогенеза, основанного на

использовании способности секретома МСК восстанавливать нишу сперматогониальных стволовых клеток. По своей актуальности, объему выполненных исследований, научной новизне, методическому уровню, теоретической и практической значимости, достоверности результатов и обоснованности выводов представленная диссертация в виде научного доклада Ефименко Анастасии Юрьевны полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям в виде научного доклада на соискании ученой степени доктора наук (пп. №9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., в последующих редакциях), а ее автор заслуживает присвоения ей искомой ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных.

Соискатель имеет 158 опубликованных научных работ, в том числе по теме диссертации за последние 10 лет (2014-2023 гг.) опубликовано 52 статьи в журналах из Перечня ведущих российских рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК, в том числе 35 статей в журналах первого и второго квартилей (Q1 и Q2, соответственно), индексируемых базами данных Web of Science и Scopus, и 16 статей в научных изданиях, индексируемых наукометрической базой данных RSCI. По теме диссертации получено 7 патентов на изобретение РФ.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. (Q1) Basalova N., Arbatskiy M., Popov V., Grigorieva O., Vigovsky M., Zaytsev I., Novoseletskaya E., Sagaradze G., Danilova N., Malkov P., Cherniaev A., Samsonova M., Karagyaour M., Tolstoluzhinskaya A., Dyachkova U., Akopyan Z., Tkachuk V., Kalinina N., **Efimenko A.** Mesenchymal stromal cells facilitate resolution of pulmonary fibrosis by miR-29c and miR-129 intercellular transfer. *Experimental and Molecular Medicine*. 2023; 55: 1399–1412. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01017-w>
2. (Q1) Novoseletskaya, E.S., Evdokimov, P.V. & **Efimenko, A.Y.** Extracellular matrix-induced signaling pathways in mesenchymal stem/stromal cells. *Cell Communication and Signaling*. 2023; 21: 244. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01252-8>

3. (Q1) Sagaradze G, Monakova A, Efimenko A. Potency Assays for Mesenchymal Stromal Cell Secretome-Based Products for Tissue Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(11):9379.. <https://doi.org/10.3390/ijms24119379>

4. (Q1) Basalova N, Illarionova M, Skryabina M, Vigovskiy M, Tolstoluzhinskaya A, Primak A, Chechekhina E, Chechekhin V, Karagyaur M, **Efimenko A**. Advances and Obstacles in Using CRISPR/Cas9 Technology for Non-Coding RNA Gene Knockout in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Non-Coding RNA*. 2023; 9(5):49. <https://doi.org/10.3390/ncrna9050049>

5. (Q1) Grigorieva O., Basalova N., Vigovskiy M., Arbatskiy M., Dyachkova U., Kulebyakina M., Kulebyakin K., Tyurin-Kuzmin P., Kalinina N., **Efimenko A**. Novel Potential Markers of Myofibroblast Differentiation Revealed by Single-Cell RNA Sequencing Analysis of Mesenchymal Stromal Cells in Profibrotic and Adipogenic Conditions. *Biomedicines*. 2023; 11(3): 840. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030840>

6. (Q1) Sagaradze GD, Monakova AO, Basalova NA, Popov VS, Balabanyan VY, **Efimenko AY**. Regenerative medicine for male infertility: a focus on stem cell niche injury models. *Biomedical Journal*. 2022; 45(4): 607-614. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2022.01.015>

7. (Q1) Voynova E, Kulebyakin K, Grigorieva O, Novoseletskaya E, Basalova N, Alexandrushkina N, Arbatskiy M, Vigovskiy M, Sorokina A, Zinoveva A, Bakhchinyan E, Kalinina N, Akopyan Z, Tkachuk V, Tyurin-Kuzmin P and **Efimenko A**. Declined adipogenic potential of senescent MSCs due to shift in insulin signaling and altered exosome cargo. *Front. Cell Dev. Biol*. 2022; 10:1050489. doi: 10.3389/fcell.2022.1050489

8. (Q1) Monakova, A., Sagaradze, G., Basalova, N., Balabanyan, V., **Efimenko, A**. Novel Potency Assay for MSC Secretome-Based Treatment of Idiopathic Male Infertility Employed Leydig Cells and Revealed Vascular Endothelial Growth Factor as a Promising Potency Marker. *International Journal of Molecular Science*. 2022, 23(16), 9414. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/16/9414>

9. (Q1) Grigorieva O., M. Arbatskiy, E. Novoseletskaya, U. Dyachkova, A. Ishkin, N. Kalinina, and **A. Efimenko**. Platelet-derived growth factor induces SASP-associated gene expression in human multipotent mesenchymal stromal cells but does not promote cell senescence. *Biomedicines*. 2021; 9(10):1290–1290. DOI:10.3390/biomedicines9101290

10. (Q1) Basalova N., Sagaradze G., Arbatskiy M., Evtushenko E., Kulebyakin K., Grigorieva O., Akopyan Z., Kalinina N., **Efimenko A.** Secretome of Mesenchymal Stromal Cells Prevents Myofibroblasts Differentiation by Transferring Fibrosis-Associated microRNAs within Extracellular Vesicles. *Cells* 2020; 9(5): 1272. doi: 10.3390/cells9051272

11.(Q1) Sagaradze G., Basalova N., **Efimenko A.**, Tkachuk V. Mesenchymal stromal cells as critical contributors to tissue regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020; 8: 1-13. doi: 10.3389/fcell.2020.576176

12.(Q1) Novoseletskaia E., Grigorieva O., Nimiritsky P., Basalova N., Eremichev R., Milovskaya I., Kulebyakin K., Kulebyakina M., Rodionov S., Omelyanenko N., **Efimenko A.** Mesenchymal stromal cell-produced components of extracellular matrix potentiate multipotent stem cell response to differentiation stimuli. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020; 8: 555378. DOI: 10.3389/fcell.2020.555378

13. (Q2) Makarevich P.I., **Efimenko A.Yu**, Tkachuk V.A. Biochemical Regulation of Regenerative Processes by Growth Factors and Cytokines: Basic Mechanisms and Relevance for Regenerative Medicine. *Biochemistry (Moscow)* 2020; 85(11): 11-26. <https://doi.org/10.1134/S0006297920010022>

14.(Q1) Sagaradze G., Basalova N., Kirpatovsky V., Ohobotov D., Nimiritsky P., Grigorieva O., **Efimenko A.** A magic kick for regeneration: role of mesenchymal stromal cell secretome in spermatogonial stem cell niche recovery. *Stem cell research & therapy*. 2019; 10(1): 1-10. doi: 10.1186/s13287-019-1479-3

15.(Q1) Sagaradze G., Grigorieva O., Nimiritsky P., Basalova N., Kalinina N., Akopyan Z., **Efimenko A.** Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: towards the clinical translation. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20(7): 1-16. doi: 10.3390/ijms20071656

16.(Q2) Novoseletskaia E., Grigorieva O., **Efimenko A.**, and Kalinina N.. Extracellular matrix in the regulation of stem cell differentiation. *Biochemistry (Moscow)*, 84(3):232–240, 2019. DOI: 10.1134/S0006297919030052

17.(Q1) Sagaradze G., Basalova N., Kirpatovsky V., Ohobotov D., Grigorieva O., Balabanyan V., Kamalov A., and **Efimenko A.** Application of rat cryptorchidism model for the evaluation of mesenchymal stromal cell secretome regenerative potential. *Biomedicine*

and Pharmacotherapy, 109:1428–1436, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.174

18. (Q1) Kalinina N., Kharlampieva D., Loguinova M., **Efimenko A.**, Ischenko D., Alekseev D., Grigorieva O., Sysoeva V., Rubina K., Lazarev V., Govorun V., Ageeva L., Sharonov G., Pobeguts O., and Butenko I. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6: 221. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0209-8>

19. (Q1) Dzhoyashvili N.A., **Efimenko A.Yu.**, Kochegura T.N., Kalinina N.I., Koptelova N.V., Sukhareva O.Yu., Shestakova M.V., Akchurin R.S., Tkachuk V.A., Parfyonova Ye.V. Disturbed angiogenic activity of adipose-derived stromal cells obtained from patients with coronary artery disease and diabetes mellitus type 2. *Journal of Translational Medicine.* 2014; 12: 337. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0337-4>

20.(Q1) **Efimenko A.Yu.**, Dzhoyashvili N.A., Kalinina N.I., Kochegura T.N., Akchurin R.S., Tkachuk V.A., Parfyonova Ye.V. Adipose-derived stromal cells (ADSC) from aged patients with coronary artery disease keep MSC properties but exhibit age markers and have an impaired angiogenic potential. *Stem Cells Translational Medicine.* 2014; 3(1): 32-41. doi: 10.5966/sctm.2013-0014

В диссертации в виде научного доклада отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

На диссертацию в виде научного доклада и автореферат поступили 8 положительных отзывов:

1. Доктора медицинских наук, профессора кафедры морфологии и общей патологии, руководителя лаборатории клеточных и микрофлюидных технологий Сибирского государственного медицинского университета, Хлусова Игоря Альбертовича. Отзыв положительный. Принципиальных замечаний не имеется. В плане научной дискуссии желательно уточнение, что подразумевается под понятием «ниши» стволовой клетки и чем ниша принципиально отличается от понятия микроокружение?
2. Доктора биологических наук, профессора, заведующего лабораторией клеточной биологии и патологии развития Федерального государственного бюджетного

научного учреждения "Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии", Сабуриной Ирины Николаевны. Отзыв положительный, принципиальных замечаний нет. Отмечено, что в работе подняты важные вопросы, которые требуют дальнейших исследований, например, меняется ли генерация фракций секретома и их состав, а также их роль в регуляции межклеточных взаимодействий в разных тканях и органах с учетом возрастных изменений для понимания процессов запрограммированного или преждевременного старения.

3. Доктора биологических наук, заведующего отделом геномной медицины им. В.С. Баранова Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Глотова Андрея Сергеевича. Отзыв положительный, замечаний нет.
4. Доктора биологических наук, доцента, руководителя Центра клеточных технологий Института цитологии Российской академии наук, Михайловой Натальи Аркадьевны. Отзыв положительный, замечаний нет.
5. Доктора медицинских наук, профессора, директора Института фундаментальной медицины и биологии, заведующего кафедрой морфологии и общей патологии, Центр медицины и фармации, Высшая школа медицины Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Киясова Андрея Павловича. Отзыв положительный, замечаний нет.
6. Доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Дризе Нины Иосифовны. Отзыв положительный, замечаний нет.
7. Доктора химических наук, главного научного сотрудника, руководителя лаборатории биомедицинских материалов ГНЦ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им.



академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Марквичевой Елены Арнольдовны. Отзыв положительный, замечаний нет.

8. Кандидата биологических наук, заведующего научной лабораторией клеточных технологий, доцента кафедры нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова, Приволжского исследовательского медицинского университета, Егорихиной Марфы Николаевны. Отзыв положительный, замечаний нет.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации для оппонирования диссертации обосновывается необходимостью привлечения специалистов в области физиологии и регенеративной медицины, занимающихся изучением механизмов регенерации тканей и функционирования тканеспецифичных ниш стволовых клеток, в том числе опухолевых стволовых клеток, а также специалистов, занимающихся вопросами репродуктивной медицины.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Сформулирована научная идея о ключевой роли секрета МСК в реализации регенераторных эффектов этих клеток на ниши стволовых клеток и раскрыты клеточные и молекулярные механизмы восстановления ниш при введении секрета МСК. Полученные результаты могут стать основой для дальнейшего углубленного изучения механизмов участия МСК в регуляции регенерации тканей через воздействие на ниши тканеспецифичных стволовых клеток.

Доказана способность МСК через действие секрета восстанавливать функцию ниши на примере увеличения фертильности самцов крыс при нарушении сперматогенеза, подавлять развитие фиброза в исходе повреждения и регулировать направленную дифференцировку стволовых клеток.

Предложен терапевтический подход, основанный на применении секрета МСК для направленной модуляции ниш стволовых клеток с целью стимуляции регенерации тканей.

Разработана и оптимизирована технология получения и стандартизации прототипа биологического лекарственного препарата на основе секрета МСК человека.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

Полученные в рамках диссертационной работы результаты расширяют понимание физиологической роли МСК в регуляции ниш тканеспецифичных стволовых клеток. МСК входят в состав большинства известных ниш постнатальных стволовых клеток и являются ключевыми клетками, участвующими в поддержании функционирования ниш в норме и при повреждении, благодаря способности воспринимать системные и локальные сигналы, регулировать дифференцировку стволовых и прогениторных клеток, активизировать восстановление компонентов ниши и привлекать в нее функциональные клетки, обеспечивать адекватные регуляторные сигналы в нише и стимулировать ангиогенез и нейрогенез. Полученные результаты доказывают, что указанные механизмы реализуются преимущественно за счет секреции МСК биоактивных факторов, воздействующих на компоненты ниши.

Применительно к проблематике диссертации результативно использованы физиологические модели повреждения ниш стволовых клеток у животных, различные клеточные модели, в том числе с использованием первичных клеток, выделенных из тканей человека и животных, комплекс современных высокотехнологичных цитологических, гистологических, биохимических и молекулярно-биологических методов для решения поставленных задач.

Выделены и охарактеризованы различными методами основные фракции секретируемых белковых факторов, молекул, переносимых в составе внеклеточных везикул, и компонентов внеклеточного матрикса в составе секрета МСК человека. Показано, что состав секрета изменяется при старении МСК и под действием факторов, связанных с повреждением тканей, что существенно влияет на способность этих клеток участвовать в обновлении и регенерации тканей.

Раскрыты механизмы участия секрета МСК в регенераторном действии этих клеток на нишу стволовых клеток на примере повреждения ниши сперматогониальных стволовых клеток в модели двустороннего абдоминального крипторхизма у крыс. Показано, что эффекты МСК и секрета этих клеток в отношении восстановления поврежденной ниши сравнимы, что указывает на важнейшую роль паракринной активности этих клеток в нише. При этом обнаружено, что регенераторные эффекты секрета МСК реализуются преимущественно на уровне поддерживающих клеток

ниши.

Установлено, что все фракции секрета МСК могут участвовать в регуляции функций мультипотентных стволовых клеток и поддерживающих клеток, входящих в состав их ниш. Так секретируемые МСК факторы роста, в том числе такие как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактор роста гепатоцитов (HGF), а также микроРНК, переносимые в составе внеклеточных везикул (микроРНК-21, -29с, -92а, -129), играют критически важную роль в способности МСК стимулировать ангиогенез и подавлять развитие фиброза путем ингибирования дифференцировки фибробластов в миофибробласты и стимуляции дедифференцировки миофибробластов, что было показано на моделях *in vitro* и *in vivo*. Установлены механизмы, за счет которых секретируемые МСК компоненты внеклеточного матрикса поддерживают жизнеспособность колоний тканеспецифичных стволовых клеток и потенцируют ответ МСК при индукции дифференцировки в различных направлениях.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

Данные диссертационного исследования были использованы для разработки новых подходов к лечению тяжелых заболеваний с помощью методов регенеративной медицины в рамках направления так называемой “клеточной терапии без клеток”, основанной на использовании компонентов клеточного секрета в качестве терапевтических средств. Полученные экспериментальные результаты позволили впервые обосновать возможность восстановления поврежденной ниши сперматогониальной стволовой клетки с помощью экзогенного локального введения секрета МСК и доказать преимущества этого подхода по сравнению с локальным введением самих клеток. На основании этих результатов разработан прототип биологического лекарственного препарата «МедиРег» на основе секрета МСК человека для лечения мужского бесплодия необструктивного генеза, предложен механизм действия препарата, разработаны технология получения и подходы к его стандартизации. Полученные результаты доклинического изучения эффективности и безопасности препарата вошли в состав регистрационного досье с целью получения разрешения на проведение клинических исследований.

Практическая значимость полученных результатов подтверждается также получением 7 патентов на изобретение РФ.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

Экспериментальные результаты получены с использованием современных методов клеточной и молекулярной биологии, физиологии, гистологии, биохимии, биоинформатики, оригинальных, клеточных и животных моделей, релевантных поставленным задачам. Достоверность результатов экспериментов обеспечивается за счет достаточного количества наблюдений, адекватной выборки экспериментальных групп, грамотным использованием современных методов статистической обработки данных и аналитических методов исследования.

Интерпретация результатов была проведена на основании анализа известных, проверяемых данных мировой научной литературы по соответствующей тематике. Полученные результаты согласуются с опубликованными современными теоретическими представлениями и экспериментальными данными в области физиологии регенеративных процессов.

Положения, выносимые на защиту, сформулированы конкретно и научно обоснованы. Выводы сделаны на основании собственных экспериментальных данных, представленных в работе, отвечают на поставленные цели и задачи и являются корректными.

Личный вклад соискателя состоит в том, что все представленные данные получены Ефименко А.Ю. или под ее непосредственным руководством. Ефименко А.Ю. лично планировала дизайн экспериментов и осуществляла контроль их выполнения на всех этапах работы, проводила выбор методов, критический анализ результатов, статистическую обработку данных, создание иллюстративного материала для экспериментальных данных, подготовку публикаций, тезисов, монографий и патентных заявок по теме диссертации. Диссертация в виде научного доклада Ефименко А. Ю. является самостоятельной научно-исследовательской работой, которая свидетельствует о профессиональной компетенции автора. Все основные полученные результаты диссертационной работы были представлены автором на российских и международных конференциях, а также опубликованы в журналах,

входящих в перечень рецензируемых научных изданий ВАК и индексируемых в базах данных Scopus и/или Web of Science или RSCI. Тексты диссертации в виде научного доклада и автореферата были подготовлены и написаны непосредственно автором.

В ходе защиты диссертации в виде научного доклада были высказаны следующие критические замечания и вопросы. Андреева Е.Р. указала, что в докладе не был упомянут тканевой источник МСК, а также спросила, какие эффекты имеют факторы в составе вневезикулярной фракции растворимых факторов секретома МСК на фиброз. Фомина Е.В. отметила, что в докладе было хорошо описано, как соискатель выстроила логику работы, и попросила уточнить, что нового было привнесено в сформулированную концепцию по результатам, полученным в рамках диссертационного исследования, и как это дополняет картину мира по исследованной проблеме. Пономарев С.А. спросил, каковы могут быть молекулярные механизмы специфичности воздействия внеклеточного матрикса, секретируемого МСК, на дифференцировку стволовых клеток. Тарасова О.С. уточнила, были ли выявлены какие-то корреляции восстановления семенников у животных при введении секретома МСК с изменениями на системном уровне по состоянию мышечной ткани и других систем, а также спросила, есть ли физиологические изменения, коррелирующие с обнаруженным феноменом снижения адипогенного потенциала МСК пожилых пациентов, например, при ожирении. Попов Д.В. спросил, можно ли рассматривать увеличение экспрессии белков теплового шока, в частности, HSPA2, показанное в работе, как один из механизмов действия секретома МСК в нише ССК, а также уточнил, как можно разделить действие микроРНК в составе внеклеточных везикул и растворимых факторов в составе секретома МСК. Матвеева П.К. задала несколько практических вопросов, касающихся номера пассажа МСК, на которых было исследовано накопление сенесцентных маркеров в культуре, выраженности эффектов секретома МСК на разных временных точках после введения (1 и 3 месяца), а также использовании стволовых и прогениторных клеток как одной или разных субпопуляций при анализе влияния децеллюляризованного внеклеточного матрикса от МСК. Орлов О.И. отметил, что представленная диссертационная работа открывает новое направление в физиологии и регенеративной медицине и, с одной стороны,

подчеркнул, что важен выход полученных результатов в практическую медицину, с другой стороны, уточнил, каким может быть развитие данной работы в дальнейшем с точки зрения соискателя.

Соискатель Ефименко А.Ю. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию. Она уточнила, что в основном в работах были использованы МСК из жировой ткани как доступного и удобного источника для клеток, но были проверено и влияние клеток из тканеспецифичных источников, например, из семенников, на нишу, что позволяет говорить об определенной универсальности действия МСК. На клеточной модели дифференцировки фибробластов было показано, что фракция растворимых факторов секретома МСК способна блокировать дифференцировку фибробластов, однако значительно слабее действует на дедифференцировку миофибробластов, и когда эта фракция была введена мышам с фиброзом легких не были обнаружены антифибротические эффекты, а наоборот, наблюдалась тенденция к ухудшению состояния легочной ткани. В настоящее время продолжают исследования по выяснению молекулярных механизмов этого эффекта. Соискатель отметила, что еще с 60х годов прошлого века, когда МСК были открыты в костном мозге, началось активное изучение их участия в поддержании стволовых клеток, так, хорошо исследовано взаимодействие МСК с ГСК в нише костного мозга, и известно уже несколько субпопуляций МСК, участвующих в поддержании ниши. В то же время во многих других тканеспецифичных нишах, хотя и были известны отдельные примеры влияния МСК в нише на стволовые клетки за счет отдельных секреторируемых факторов, однако молекулярные механизмы, за счет каких фракций секретома МСК могут участвовать в этих процессах, оставалось во многом неясным. В нише сперматогониальных стволовых клеток роль МСК вообще не была изучена. Поэтому результаты, полученные на нише ССК, которая является хорошей моделью, как минимум, ниш эпителиальных стволовых клеток, показывают впервые, что все фракции секретома могут влиять, в первую очередь, на поддерживающие клетки ниши. В работе были раскрыты конкретные механизмы, которые опосредуют эти эффекты, что может дать новый импульс к исследованию роли МСК в других нишах. Соискатель подчеркнула, что важным результатом работы является выяснение

механизмов влияния МСК на фибробласты, которые локализуются во всех нишах и играют критическую роль в модуляции ниши стволовых клеток, обеспечивающих регенерацию тканей, в фиброгенную нишу как неблагоприятный исход заживления поврежденных тканей. Ефименко А.Ю. отметила, что полученные на модели фиброза легких результаты легли в основу разработки еще одного биологического препарата на основе везикулярной фракции секрета МСК человека для лечения фиброза легких. Данные, касающиеся влияния внеклеточного матрикса как важного регуляторного компонента ниши, раскрывают новые механизмы воздействия конкретных компонентов матрикса на стволовые клетки. Касательно специфичности воздействия внеклеточного матрикса, секретируемого МСК, на стволовые клетки, соискатель уточнила, что это может быть связано как с составом структурных белков, так и минорных матриксных белков, а также содержанием депонированных в матриксе факторов роста и внеклеточных везикул, которые могут быть клетка-специфичными и тканеспецифичными и опосредовать особое воздействие на стволовые клетки в нише. В ответ на вопрос о системных изменениях при локальном введении секрета МСК в семенники Ефименко А.Ю. согласилась, что это важный вопрос, который остался вне рамок исследования, но в работе изучали только общеклинические показатели состояния животных и некоторые параметры системного кровотока, и поблагодарила за интересную идею расширения области исследований. Соискатель отметила, что при обсуждении снижения адипогенного потенциала МСК при старении следует упомянуть, в первую очередь, развитие инсулинорезистентности и лептинрезистентности как системного феномена, связанного с возрастом, и прокомментировала, что в дальнейших исследованиях было показана взаимосвязь нарушения способности МСК пожилых доноров к адипогенной дифференцировке с измененным ответом этих клеток на инсулин, что может играть существенную роль в патогенезе инсулинорезистентности организма и связанных с этим возраст-зависимых заболеваний. Ефименко А.Ю. уточнила, что белок HSPA2 был использован в качестве маркера восстановления клеток сперматогенного дифферона в сперматогенных канальцах и поблагодарила за идею рассмотреть его в качестве одного из медиаторов положительного влияния МСК на нишу ССК через действие секрета. Касательно

разделения разных фракций секрета соискатель пояснила, что в основном был использован подход физического разделения фракций методом ультрафильтрации через фильтры с различным размером пор и последующим контролем содержания внеклеточных везикул в этих фракциях с помощью анализа траекторий наночастиц (NTA), а компоненты внеклеточного матрикса выделяли с помощью децеллюляризации многоклеточных конструкций из МСК. Ефименко А.Ю. уточнила, что для изучения влияния возраста на фенотип и свойства МСК были использованы клетки максимально ранних пассажей – 1 или 2 – с целью минимизации влияния на клетки сенесцентного воздействия при длительном культивировании. Соискатель прокомментировала, что при рассмотрении динамики изменения комплекса параметров, отражающих восстановление ниши ССК было обнаружено, что восстановление сперматогенеза происходит только к 3му месяцу, в то время как ряд показателей, характеризующих восстановление поддерживающих клеток ниши, улучшался уже к 1му месяцу наблюдения, что позволило сделать вывод о преимущественном влиянии секрета МСК на нишу, а затем опосредованное воздействие на функцию ССК и, соответственно, сперматогенез. Ефименко А.Ю. также уточнила, что в экспериментах по оценке влияния дВКМ от МСК на стволовые клетки использовали одну и ту же популяцию, но считали клетки, способные к образованию колоний в культуре, активированными прогениторными клетками, а в исследованиях по изучению маркеров стволовых клеток не обнаружили разницы в их экспрессии под влиянием матрикса от МСК. В ответ на вопрос о перспективах развития направления, заданного диссертационной работой, Ефименко А.Ю. прокомментировала, что важным направлением может быть поиск решения вопроса о важности тканеспецифичности МСК в регуляции ниш стволовых клеток, что имеет критическое значение для дальнейшего использования предложенного терапевтического подхода в биофармацевтике, а второе направление может быть связано с изучением механизмов патологических изменений ниши стволовых клеток при старении и других состояниях, на которые можно было бы повлиять с учетом полученных в работе научных данных.

На заседании 26.04.2024 г. диссертационный совет принял решение - за разработку



научной проблемы и разработку теоретических положений, раскрывающих физиологические механизмы участия МСК в регуляции ниш тканеспецифичных стволовых клеток за счет действия компонентов их секретома, которые можно квалифицировать как научное достижение, имеющее важное социальное значение позволяющее предложить новый подход к лечению мужского бесплодия с помощью использования секретома МСК в качестве основы биологического лекарственного препарата, направленного на восстановление ниши сперматогониальных стволовых клеток, присудить Ефименко А.Ю. ученую степень доктора медицинских наук по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 25 человек, из них 12 докторов наук по специальности 1.5.5. – Физиология человека и животных, участвовавших в заседании, из 35 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени - 25 , против присуждения ученой степени - 0, недействительных бюллетеней – 0.

Председатель диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, академик РАН



Орлов Олег Игоревич

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Поддубко Светлана Викторовна