ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора, заведующего лаборатории термодинамики биосистем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН) Розенфельда Марка Александровича на диссертацию Бутова Кирилла Романовича на тему «Исследование тромбоцитарных везикул как регуляторов тромбопоэтин-независимого мегакариопоэза», представленную к защите в диссертационный совет 99.1.098.02 на базе ФГБУН ЦТП ФХФ РАН и ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа посвящена изучению роли внеклеточных везикул тромбоцитарного и мегакариоцитарного происхождения в регуляции мегакариоцитопоэза. Мегакариоцитопоэз традиционно рассматривается как процесс, регулируемый преимущественно цитокинами, в первую очередь тромбопоэтином. Вместе с тем для многих типов клеток описано существование дополнительных регуляторных механизмов, связанных с влиянием микроокружения и взаимодействием с циркулирующими везикулами. В этом контексте внеклеточные везикулы могут выступать в качестве самостоятельных регуляторных элементов, обеспечивающих перенос сигнальных молекул между клетками кроветворной системы. В связи с этим актуальным вопросом становится исследование везикул, продуцируемых как тромбоцитами, так и мегакариоцитами. Анализ их фенотипических и функциональных характеристик и распределения в организме остается слабо изученным в области. Также важным аспектом является также исследование способов анализа уровня экспозиции фосфатидилсерина на поверхности внеклеточных везикул, поскольку данный компонент мембраны напрямую связан с их биологической активностью и межклеточными взаимодействиями. Использование Аннексина V на данный момент считается «золотым стандартом», однако имеет ряд недостатков, связанных с кальций-зависимостью данного сенсора. В связи с этим адаптация новых подходов

(например, использование лактадгерина и его доменов) к детекции фосфатидилсерина имеет значение как для фундаментальных представлений о механизмах регуляции кроветворения, так и для разработки экспериментальных подходов к их анализу в клинике.

Научная и практическая значимость полученных результатов

Полученные в диссертационной работе результаты основаны на комплексном и методически выверенном подходе к исследованию роли внеклеточных везикул тромбоцитарного и мегакариоцитарного происхождения в регуляции мегакариоцитопоэза. Существенным вкладом работы является самостоятельная разработка и адаптация автором междисциплинарных методологических решений, включая оптимизацию получения и культивирования мегакариоцитов человека из малых объёмов аспиратов костного мозга, что позволило получить функционально полноценные клетки и продемонстрировать их способность к формированию протромбоцитов даже при работе с ограниченным и вариабельным клиническим материалом. Кроме того, разработан и экспериментально валидирован рекомбинантный сенсор фосфатидилсерина на основе C2-домена лактадгерина; сравнительный анализ вариантов конструкций позволил определить решения, повышающие растворимость белка и снижающие его агрегацию, а также оптимизировать параметры химической модификации. Роль внеклеточных везикул подтверждена на нескольких моделях, включая мышей с нокаутом рецептора тромбопоэтина (cMpl$^{-/-}$), где показаны накопление тромбоцитов и микровезикул дикого типа в костном мозге и способность тромбоцитарных везикул взаимодействовать с гемопоэтическими клетками, индуцируя мегакариоцитарную дифференцировку. Дополнительно выполнено прямое сопоставление везикул из периферической крови и культур мегакариоцитов человека, выявившее фенотипические различия, в том числе преобладание фосфатидилсерин-положительных структур в тромбоцитарной фракции, что важно для функциональной классификации везикулярных популяций.

В совокупности представленные в работе результаты и разработанные методические подходы формируют целостную экспериментальную и концептуальную основу для дальнейших исследований в области изучения системы клеточного гемостаза и несомненно являются достаточными для соискания степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов

Обоснованность и достоверность полученных в диссертационной работе результатов обеспечены корректной постановкой экспериментальных задач, использованием нескольких экспериментальных моделей и современных методов исследования. В работе применены культуры мегакариоцитов человека и мыши, полученные из различных источников, мышиные модели с нокаутом рецептора к тромбопоэтину. Использовались различные методы выделения и фенотипической характеристики внеклеточных везикул, проточная цитометрия, сортировка и технически сложные техники флуоресцентной микроскопии, что позволило получить воспроизводимые данные и подтвердить сформулированные выводы на независимых моделях. Экспериментальные результаты подвергнуты адекватной статистической обработке, а интерпретация данных проведена с учетом современных представлений о внеклеточных везикулах и механизмах регуляции мегакариоцитопоэза, что позволяет считать выводы диссертационной работы обоснованными и достоверными.

Научная новизна полученных результатов

Автором был впервые показан тромбопоэтин независимый путь дифференцировки гемопоэтических клеток в мегакариоциты за счет связывающихся тромбоцитарных внеклеточных везикул. Кроме того, был разработан подход к получению дифференцированных мегакариоцитов человека, а также к синтезу труднорастворимого высокочувствительного сенсора фосфатидилсерина на основе С2-домена лактадгерина. С помощью разработанных

методов была также продемонстрирована разница в фенотипе везикул в периферической крови и костном мозге человека.

Общая характеристика, структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста; включает 5 таблиц, 39 рисунков и список литературы из 287 источников (3 отечественных и 284 зарубежных). Структурно работа выдержана в классическом стиле и содержит оглавление, введение, обзор литературы (глава 1), «Материалы и методы исследования» (глава 2), «Результаты и обсуждение» (глава 3), «Заключение» (глава 4), выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы и раздел благодарностей. Автореферат соответствует основным идеям и выводам диссертации, в нем изложены все основные положения, он написан доступным языком и достаточно иллюстрирован.

Во введении корректно обоснована актуальность исследования, сформулированы цель и задачи работы, определены объект и предмет исследования, отражены положения, выносимые на защиту, а также отражены теоретическая и практическая значимость результатов.

В главе 1 («Обзор литературы») систематизированы современные представления о составе и продукции внеклеточных везикул и их роли в межклеточной коммуникации, а также подробно рассмотрены ключевые положения, относящиеся к мегакариоцитопоэзу, включая регуляторную роль тромбопоэтина и механизмы функционирования тромбопоэтинового рецептора. В обзоре четко обозначен существующий уровень разработанности проблемы, а также выделены научные пробелы, на восполнение которых направлено диссертационное исследование.

В главе 2 («Материалы и методы исследования») детально описаны используемые модельные объекты и методический арсенал, включая получение и культивирование мегакариоцитов человека, работу с образцами крови и костного мозга, использование мышиных моделей (C57bl/6 и cMpl$^{-/-}$), а также комплекс аналитических методик (проточная цитофлуориметрия, конфокальная

микроскопия, спектрофотометрические, культуральные и биохимические подходы). Стоит отметить достаточно подробное описание молекулярно-биологического подхода к получению рекомбинантного С2-домена лактадгерина.

В главе 3 («Результаты и обсуждение») последовательно изложены экспериментальные данные и их интерпретация: представлены результаты по получению дифференцированных культур мегакариоцитов, анализу фенотипа и распределения везикулярных популяций генерируемыми тромбоцитами и мегакариоцитами, исследованию взаимодействия тромбоцитарных везикул с гемопоэтическими клетками и их влияния на дифференцировку, а также апробации рекомбинантных сенсоров фосфатидилсерина на основе С2-домена лактадгерина. В конце каждого подраздела автор обсуждает полученные результаты. Раздел хорошо иллюстрирован: приведены корректно обработанные микроскопические изображения, а также графический материал (гистограммы и диаграммы проточной цитометрии, сравнительные графики и схемы), представленный в наглядной форме и сопровождаемый необходимыми количественными оценками и статистической обработкой.

В заключении (глава 4) подведены итоги выполненного исследования и обобщены основные результаты.

Раздел «Выводы» содержит итоговые положения, сформулированные на основании представленного фактического материала и соответствующие полученным результатам, поставленным задачам и положениям, выносимым на защиту.

В разделе «Практические рекомендации» приведены предложения по применению разработанных подходов (возможность использования аспиратов костного мозга для получения функциональных мегакариоцитов; использования комбинации маркеров CD62p и экспозиции фосфатидилсерина для исследования везикул; предпочтительность фьюжн-вариантов рекомбинантного С2-домена лактадгерина для цитометрического анализа).

Текст диссертации изложен грамотным научным языком, а материал представлен последовательно и логично. Существенных замечаний по стилю и

оформлению работы не имеется; отдельные стилистические неточности и погрешности носят частный характер и не влияют на содержание исследования, интерпретацию полученных результатов и сформулированные выводы.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 5 работ врецензируемых журналах рекомендованных ВАК при Минобрнауки и 5 тезисов докладов на международных и отечественных конференциях.

Замечания и вопросы

Принципиальных замечаний по содержанию работы нет. В формате дискуссии хотелось бы задать автору следующие вопросы:

1. Как автор может объяснить увеличение растворимости флуоресцентных вариантов C2-домена лактадгерина при рекомбинантном синтезе?
2. Почему автором для оценки везикул используются различные маркеры, такие как CMPTX, MitoTracker, PKH67, не удобнее ли было использование одного красителя во всей работе?

Следует отметить, что вопросы носят дискуссионный характер и не снижают научную ценность и достоверность полученных результатов.

Заключение

Диссертационная работа Бутова Кирилла Романовича на тему «Исследование тромбоцитарных везикул как регуляторов тромбопоэтин-независимого мегакариопоэза» представляет собой законченную самостоятельную научно-квалификационную работу, которая вносит значительный вклад в понимание новых механизмов регуляции мегакариоцитопоэза через внеклеточные везикулы, а также в совершенствование экспериментальных подходов к получению мегакариоцитов человека и исследованию фосфатидилсерина на поверхности мембран. По своей актуальности, новизне, практической и теоретической значимости, методическому уровню и объему выполненных исследований работа

соответствует требованиям п. 9-11 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (со всеми действующими изменениями и дополнениями), предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата наук, а ее автор, Бутов Кирилла Романович, несомненно заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией термодинамики биосистем Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН) доктор биологических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика, профессор

Розенфельд Марк Александрович

«26» января 2026 г.

Адрес организации: 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д.4

Контактные телефоны: +7(910)443-82-00; +7(499)137-64-20

Электронный адрес: rosenfeld41@mail.ru

Подпись Розенфельда Марка Александровича заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН)

к.б.н Скалацкая Светлана Ивановна

В диссертационный совет 99.1.098.02

на базе федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, Министерство науки и высшего образования Российской Федерации (109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30);

федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (117998, г. Москва, ул. Саморы Машела, д. 1)

СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по диссертации Бутова Кирилла Романовича, соискателя ученой степени кандидата биологических наук, на тему: «Исследование тромбоцитарных везикул как регуляторов тромбопоэтин-независимого мегакариопоэза» по специальности 1.5.2. Биофизика.

Фамилия, Имя, Отчество (полностью)	Ученая степень, наименование отрасли науки, научных специальностей, по которым им защищена диссертация. Ученое звание (при наличии).	Полное название и адрес организации, являющейся основным местом работы официального оппонента (на момент предоставления отзыва)	Занимаемая должность в организации (на момент предоставления отзыва)	Список основных публикаций в рецензируемых научных изданиях (не менее 5-ти работ за последние 5 лет по теме оппонируемой диссертации)
Розенфельд Марк Александрович	доктор биологических наук (1.5.2 - биофизика), профессор	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН); 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д.4 Тел.: +7(499) 135-7894 E-mail: ibcp@sky.chph.ras.ru	Заведующий лабораторией термодинамики биосистем	1. Rosenfeld MA, Yurina LV, Gavrilina ES, Vasilyeva AD. Post-Translational Oxidative Modifications of Hemostasis Proteins: Structure, Function, and Regulation. Biochemistry (Mosc). 2024;89(Suppl 1):S14-S33. doi:10.1134/S0006297924140025 2. Vasilyeva AD, Ivanov VS, Yurina LV, et al. Peroxide-Induced Damage to Plasminogen Molecules. Dokl Biochem Biophys. 2021;501(1):419-423. doi:10.1134/S1607672921060053

				3. Yurina LV, Vasilyeva AD, Gavrilina ES, et al. A role of methionines in the functioning of oxidatively modified fibrinogen. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom. 2024;1872(4):141013. doi:10.1016/j.bbapap.2024.141013 4. Rosenfeld MA, Yurina LV, Vasilyeva AD. Antioxidant role of methionine-containing intra- and extracellular proteins. Biophys Rev. 2023;15(3):367-383. Published 2023 Apr 10. doi:10.1007/s12551-023-01056-7 5. Yurina LV, Vasilyeva AD, Vasserman LA, Podoplelova NA, Panteleev MA, Rosenfeld MA. Effect of Hypochlorite- and Peroxide-Induced Oxidation of Fibrinogen on the Fibrin Structure. Dokl Biochem Biophys. 2021;499(1):242-246. doi:10.1134/S1607672921040189

Выше представленные данные подтверждаю и
согласен на обработку моих персональных данных:

М.А. Розенфельд
(Ф.И.О. подпись официального оппонента)

25 ноября 2025 г

Подпись официального оппонента заверяю
Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук (ИБХФ РАН)
к.б.н.

С.И. Скалацкая
(подпись, Ф.И.О. заверившего лица)

печать учреждения