УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина

ФМБА России

член-корр. РАН, д.б.н.

_____ Лагарькова М.А.

«21» января 2026 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства» о научно-практической значимости диссертационной работы Бутова Кирилла Романовича «Исследование тромбоцитарных везикул как регуляторов тромбопоэтин-независимого мегакариопоэза», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.2. Биофизика.

Актуальность темы исследования и ее связь с соответствующими отраслями науки

Диссертационная работа Бутова Кирилла Романовича посвящена актуальной и слабо изученной проблеме роли внеклеточных везикул тромбоцитарного и мегакариоцитарного происхождения в регуляции процессов мегакариопоэза и тромбоцитопоэза.

В последние годы внеклеточные везикулы рассматриваются как ключевые элементы межклеточной коммуникации, участвующие в регуляции широкого спектра физиологических и патологических процессов. Плазма крови человека содержит значительное количество везикул, подавляющее большинство которых образуется тромбоцитами и мегакариоцитами. Несмотря на это, функциональная роль тромбоцитарных везикул в регуляции гемопоэза до настоящего времени остается описанной только частично.

Особый интерес представляет тот факт, что при воспалительных состояниях и ряде онкологических заболеваний наблюдается повышение уровня тромбоцитов в крови на фоне их ускоренной активации и элиминации, что не всегда коррелирует с изменением

концентрации тромбопоэтина. Это предполагает существование дополнительных, быстрореагирующих механизмов регуляции мегакариоцитарного звена гемопоэза.

Таким образом, выбранная тема исследования является современной, научно значимой и востребованной как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

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

В диссертационной работе получен ряд результатов, обладающих несомненной научной новизной. Впервые показано, что тромбоцитарные внеклеточные везикулы способны оказывать регуляторное воздействие на дифференцировку мегакариоцитов независимо от присутствия тромбопоэтина, что расширяет современные представления о механизмах регуляции тромбоцитарного звена гемопоэза.

Автором разработан и апробирован подход к получению функционально активных мегакариоцитов из малых объемов аспиратов костного мозга человека, что имеет принципиальное значение для экспериментальных и клинико-биологических исследований с ограниченным доступом к биологическому материалу.

В работе впервые показана способность тромбоцитарных везикул инфильтрировать костный мозг, что подтверждено в экспериментах in vivo с использованием мышиных моделей и методами проточной цитофлуориметрии и иммуногистохимии. Эти данные формируют новую концепцию участия тромбоцитов и их везикул в регуляции костномозгового гомеостаза.

Существенным методологическим вкладом также является адаптация кальций-независимого сенсора фосфатидилсерина на основе С2-домена лактадгерина для анализа внеклеточных везикул методом проточной цитометрии. Данный подход позволяет проводить фенотипирование везикул без нарушения их функциональных свойств.

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием комплекса современных экспериментальных методов, включающих проточную и спектральную цитофлуориметрию и сортировку, конфокальную прижизненную микроскопию, электронную микроскопию, культуральные и биохимические подходы, а также корректный статистический анализ данных.

Соответствие содержания диссертации паспорту специальностей

Диссертационное исследование соответствует Паспорту специальности 1.5.2. Биофизика, а именно: п.1 Изучение биологических систем и процессов с целью применения

полученных знаний для создания оригинальных технических систем и технологических процессов на основе идей, найденных и заимствованных у природы, п. 3 Разработка методов исследования биологических объектов и п. 4. Изучение физических основ и проявлений регуляции (управления) в биологических объектах.

Значимость для науки и практики полученных соискателем результатов

Значимость результатов диссертационной работы для науки заключается в расширении фундаментальный представлений о механизмах регуляции мегакариопоэза и межклеточной коммуникации в гемопоэтической нише. Полученные данные о тромбопоэтин-независимом влиянии тромбоцитарных внеклеточных везикул на мегакариоцитарную дифференцировку дополняют современные модели регуляции тромбоцитарного звена гемопоэза и создают основу для дальнейших исследований роли внеклеточных везикул в норме и при патологических состояниях.

Практическая значимость работы заключается в разработке и апробации воспроизводимых методических подходов к получению функционально активных мегакариоцитов их малых объемов аспиратов костного мозга, а также в оптимизации протоколов фенотипического и функционального анализа тромбоцитарных и мегакариоцитарных внеклеточных везикул методом проточной цитофулориметрии. Полученные результаты и предложенные методические решения внедрены и активно используются в лаборатории клеточного гемостаза и тромбоза ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава РФ, а также других профильных лабораториях при изучении регуляции мегакариопоэза, оценке везикулярных маркеров в биологических жидкостях и разработке трансляционных подходов в гематологии.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал во всех этапах выполнения исследования: от анализа современной отечественной и зарубежной литературы до планирования и проведения экспериментов, обработки и интерпретации полученных данных. Разработка экспериментальных протоколов, выполнение основного объема лабораторных исследований, статистический анализ и формулирование выводов осуществлены соискателем самостоятельно либо при его непосредственном участии.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертационной работы целесообразно использовать при планировании фундаментальных и прикладных исследований, направленных на уточнение механизмов регуляции мегакариопоэза и тромбоцитопоэза в норме и при воспалительном ответе. Показанный в работе тромбопоэтин-независимый эффект тромбоцитарных внеклеточных везикул на мегакариоцитарную дифференцировку может быть включён в модельные представления о быстрых компенсаторных механизмах поддержания тромбоцитарного пула, в том числе в ситуациях, когда изменения уровня свободного тромбопоэтина недостаточны для объяснения наблюдаемой динамики тромбоцитов.

Разработанный подход к получению функционально активных мегакариоцитов из малых объёмов аспиратов костного мозга рекомендуется к использованию в исследованиях с клиническим материалом ограниченного объёма (например, при работе с остаточными объёмами аспиратов), а также для воспроизводимых in vitro моделей дифференцировки мегакариоцитов. Метод может быть применён для тестирования влияния внеклеточных факторов (включая везикулы) на мегакариоцитарный путь дифференцировки гемопоэтических предшественников и для сопоставимых межлабораторных сравнений при стандартизованных условиях культивирования.

Данные о способности тромбоцитарных везикул инфильтрировать костный мозг рекомендуется учитывать при интерпретации результатов исследований костномозгового микроокружения и межклеточной коммуникации в системе крови. В экспериментальных протоколах, моделирующих воспалительный ответ, целесообразно включать оценку доставки/накопления тромбоцитарных везикул в костном мозге как потенциального фактора, влияющего на сдвиг дифференцировки предшественников и на параметры мегакариоцитарной ниши.

Разработанный и адаптированный в работе подход к фенотипированию внеклеточных везикул методом проточной цитофлуориметрии, включая применение кальций-независимого сенсора фосфатидилсерина на основе C2-домена лактадгерина, рекомендуется использовать в качестве методологической основы для функционально-ориентированного анализа везикул. Такой подход особенно целесообразен в задачах, где требуется минимизировать влияние сенсора на мембранные взаимодействия и сохранить возможность последующей функциональной оценки везикул (включая анализ прокоагулянтных свойств).

С учётом полученных результатов представляется обоснованным применение предложенных методик для разработки исследовательских панелей мониторинга качественных и количественных характеристик тромбоцитарных/мегакариоцитарных везикул в биологических жидкостях ex vivo (плазма крови, костный мозг). В перспективе такие панели могут быть использованы в трансляционных исследованиях для поиска диагностических и прогностических маркеров нарушений тромбоцитарного звена гемостаза и регуляции мегакариопоэза при воспалительных и других системных состояниях.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы, содержащий 287 источников.

Диссертация выдержана в классическом стиле и является законченной научно-квалификационной работой. Во введении автор обосновал актуальность исследования, сформулировал цель и задачи, положения, выносимые на защиту, научную новизну, достоверность и обоснованность результатов.

В разделе «Обзор литературы» систематизированы современные представления о биогенезе и фенотипе внеклеточных везикул, их роли в межклеточной сигнализации и потенциальной связи с регуляцией гемопоэза. Автор также подробно осветил методологические аспекты изоляции и анализа внеклеточных везикул, а дает актуальные примеры для применения каждой из методик.

В разделе «Материалы и Методы» подробны описаны протоколы дифференцировки и экспансии мегакариоцитов, методы проточной цитофлуориметрии, сортировки, микроскопии, а также дизайн экспериментов in vitro и in vivo.

В главе «Результаты и обсуждение» подробно изложен разработанный подход к получению полностью функциональных дифференцированных мегакариоцитов из аспиратов костного мозга человека. Далее представлены результаты фенотипирования внеклеточных везикул, данные об их миграции в костный мозг и о тромбопоэтин-независимом влиянии на мегакариоцитарную дифференцировку. Отдельный раздел посвящён разработке метода оценки прокоагулянтной активности с применением сенсора фосфатидилсерина на основе C2-домена лактадгерина. Каждый подраздел включает анализ полученных данных, их обсуждение и интерпретацию.

В разделе «Заключение» подведены итоги выполненного исследования и обобщены полученные результаты. В сжатом и логически последовательном виде сформулированы основные выводы о роли тромбоцитарных везикул в регуляции мегакариопоэза, их фенотипе, а также методах детекции с использованием нового типа фосфатидилсеринового сенсора. Раздел соответствует поставленной цели и задачам исследования и завершает работу выводами, имеющими теоретическую и прикладную значимость.

Автореферат полностью включает в себя все аспекты, освещенные в диссертации, и содержит все основные положения работы.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационной работы опубликовано 5 статей в рецензируемых научных изданиях, 5 из них – из Перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для публикации результатов диссертации. Основные положения диссертации доложены на российских и международных конференциях.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Оформление диссертационной работы и ее содержательная часть полностью соответствуют требованиям, предъявляемым к работам данного уровня. Материал изложен структурированно, ясным и профессиональным языком. Принципиальных замечаний к работе нет. Научно-квалификационная работа Бутова К.Р. заслуживает положительной оценки

Заключение

Диссертационное исследование Бутова Кирилла Романовича «Исследование тромбоцитарных везикул как регуляторов тромбопоэтин-независимого мегакариопоэза», представленное на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика является завершенной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача определения роли внеклеточных везикул тромбоцитов и мегакариоцитов в мегакариопоэзе.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Бутова К.Р. полностью соответствует требованиям п. 9-11, 13, 14 «Положения о

порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 №842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.2. Биофизика.

Отзыв о научно-практической ценности диссертации Бутова Кирилла Романовича обсужден и одобрен на заседании Отдела клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России №1 от 20.01.2026.

Заместитель генерального директора по научной работе ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,
д.б.н., доцент Лазарев Василий Николаевич

Даю согласие на обработку моих персональных данных

_____Лазарев Василий Николаевич

Подпись д.б.н. Лазарева В.Н. заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,
к.б.н Кострюкова Елена Сергеевна

Сведения об организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства». Адрес: 119435, Москва, улица Малая Пироговская, д. 1а. Телефон: +7 (499) 246-4409; E-mail: info@rcpcm.org

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)
В аттестационное дело **Бутова К.Р.**

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

По диссертационной работе Бутова Кирилла Романовича на тему «Исследование тромбоцитарных везикул как регуляторов тромбопоэтин-независимого мегакариопоэза», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.2. Биофизика.

Полное и сокращенное наименование организации:	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»; ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России
Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность руководителя ведущей организации:	Лагарькова Мария Андреевна, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, генеральный директор
Фамилия Имя Отчество лица, утвердившего отзыв ведущей организации, ученая степень, ученое звание, должность, место работы	Лагарькова Мария Андреевна, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук (03.02.07 – генетика, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология), генеральный директор ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России
Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность сотрудника, составившего отзыв ведущей организации:	Лазарев Василий Николаевич, доктор биологических наук, доцент, заместитель генерального директора по научной работе
Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации	1. Баринова А.А., Пикина А.С., Голубинская П.А., Ручко Е.С., Еремеев А.В. In vitro оценка иммуногенности хондроцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с нокаутом B2M.

в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет:	Медицина экстремальных ситуаций. 2024; (1): –. DOI: 10.47183/mes.2024.001 2. Еремеев А.В., Пикина А.С., Владимирова Т.В., Богомазова А.Н. Методы оценки жизнеспособности клеток, культивируемых in vitro в 2d- и 3d-структурах. Гены и Клетки. 2023. Т. 18. № 1. С. 5-21. 3. Manuvera VA, Brovina KA, Babenko VV, Bobrovsky PA, Kharlampieva DD, Grafskaia EN, Serebrennikova MY, Rusavskiy NR, Polina NF, Lazarev VN. Production, Purification, and Characterization of a Novel Cysteine-Rich Anticoagulant from the Medicinal Leech and the Functional Role of Its C-Terminal Motif. *Biomolecules*. 2025; 15(12):1633. https://doi.org/10.3390/biom15121633 4. Manuvera V.A., Brovina K.A., Bobrovsky P.A., Grafskaia E.N., Kharlampieva D.D., & Lazarev V.N. (2024). METHOD TO ASSESS THE EFFECTS OF BIOACTIVE COMPOUNDS SOLUTIONS ON BLOOD CLOTTING. Extreme medicine, 26 (2), 113-117. doi: 10.47183/mes.2024.026 5. Evgeniy G. Evtushenko ,Dmitry V. Bagrov,Vassili N. Lazarev,Mikhail A. Livshits,Elena Khomyakova. Adsorption of extracellular vesicles onto the tube walls during storage in solution. PLoS One (2020) 6. Bobrovsky P, Manuvera V, Baskova I, Nemirova S, Medvedev A, Lazarev V. Recombinant Destabilase from Hirudo medicinalis Is Able to Dissolve Human Blood Clots In Vitro. Current Issues in Molecular Biology. 2021; 43(3):2068-2081. https://doi.org/10.3390/cimb43030143

Адрес ведущей организации

Индекс	119435
Объект	ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России
Город	Москва
Улица	Малая Пироговская ул.
Дом	1а
Телефон	+7 (499) 246-4409
E-mail	info@rcpcm.org
Web-сайт	https://rcpcm.ru/

Ведущая организация подтверждает, что соискатель ученой степени не является её сотрудником и не имеет научных работ по теме диссертации, подготовленных на базе ведущей организации или в соавторстве с её сотрудниками.

В соответствии с приказом Минобрнауки России от 01.07.2015 №662 «Об определении состава информации о государственной научной аттестации для включения в федеральную информационную систему государственной научной аттестации», согласие на обработку персональных данных подтверждаю

Генеральный директор
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина
ФМБА России
член-корр. РАН, д.б.н. Лагарькова Мария Андреевна

Подпись член-корреспондента РАН, доктора биологических наук, Лагарьковой Марии Андреевны заверяю:

Ученый секретарь, к.б.н Кострюкова Елена Сергеевна