

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА
24.1.204.02 НА БАЗЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА
МОРФОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА ИМЕНИ АКАДЕМИКА А.П. АВЦЫНА
ФГБНУ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ХИРУРГИИ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА Б.В. ПЕТРОВСКОГО»
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ
УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
аттестационное дело №

решение диссертационного совета от 1 июня 2023 г. № 6

о присуждении Макарову Максиму Сергеевичу, гражданину
Российской Федерации, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Биологические основы реализации регенеративного потенциала тромбоцитов человека», по специальности 1.5.22. – Клеточная биология принята к защите 20 февраля 2023 года протокол №3 диссертационным советом 24.1.204.02 на базе Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (117418 г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3), сайт организации www.med.ru, созданном в соответствии с приказом Минобрнауки России №833/нк от 12 июля 2022 г.

Соискатель Макаров Максим Сергеевич, 1986 года рождения. В 2008 году окончил биологический факультет Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова. В 2014 году защитил диссертацию на тему: "Морфофункциональный статус тромбоцитов человека в норме и патологии" с присвоением степени кандидата биологических наук по специальности «Гематология и трансфузиология» (3.1.28, биологические науки) в диссертационном совете Д.208.135.02 на базе Национального медицинского Исследовательского Центра Гематологии (Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4).

Работает в отделении биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗ г. Москвы в должности старшего научного сотрудника.

Диссертация выполнена на базе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы».

Научный консультант: Хватов Валерий Борисович, доктор медицинских наук, профессор, научный консультант отделения биотехнологий и трансфузиологии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы».

Официальные оппоненты: 1. Ельчанинов Андрей Владимирович – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией роста и развития Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», 2. Ройтман Евгений Витальевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой онкологии, гематологии и лучевой терапии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, 3. Яцковский Александр Никодимович – доктор медицинских наук, профессор, профессор по кафедре анатомии и гистологии человека ФГАОУ ВО «Первый Московский Государственный Медицинский Университет имени И.М. Сеченова Минздрава России» дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Московский научный исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена Министерства здравоохранения Российской Федерации,

(125284, г. Москва, 2-й Боткинский пр., д. 3) дала положительное заключение, подписанное заместителем генерального директора по науке д.м.н., профессором Алексеевым Б.Я., что диссертация Макарова М.С. соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 в редакции от 28.08.2017 №1024), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология.

Соискатель имеет 185 опубликованных научных работ, в том числе 69 – по теме диссертации, из них 25 работ опубликованы в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук, 35 публикаций – в материалах научных конференций, 22 публикации по теме диссертации написаны без соавторов, 47 – в соавторстве, в 26 из них соискатель является первым автором, также автор является обладателем 3 патентов и 1 методической рекомендации.

Наиболее значимые работы:

1. Makarov MS, Kobzeva EN, Vysochin IV, Borovkova NV, Khvatov VT. Morphofunctional analysis of human platelets by vital staining. Bull Exp Biol Med. 2014 Jan;156(3):409-12. doi: 10.1007/s10517-014-2360-0.

2. Макаров М.С., Хватов В.Б., Боровкова Н.В. Стабилизации тромбоцитов человека на адгезивном субстрате с помощью тикагрелора. Молекулярная медицина. 2015; 6: 57-60.

3. Makarov MS, Borovkova NV, Storozheva MV. Morphofunctional Properties of Human Platelets Treated with Silver Nanoparticles. Bull Exp Biol Med. 2017 Dec;164(2):241-246. doi: 10.1007/s10517-017-3966-9.

4. Makarov MS, Storozheva MV, Borovkova NV, Ponomarev IN. Growth-Stimulating Effect of Human Platelets Stabilized with Silver Nanoparticles. Bull Exp Biol Med. 2018 Dec;166(2):260-263.

5. Макаров М.С., Хватов В.Б. Морфофункциональные свойства тромбоцитов человека, подверженных *in situ* низкоинтенсивному лазерному облучению. *Лазерная медицина*. 2019; 2: 26-31. doi.org/10.37895/2071-8004-2019-23-2-26-31

6. Borovkova NV, Dobatkin SV, Makarov MS, Ponomarev IN, Ofitserov AA, Storozheva MV, Martynenko NS, Estrin YZ. Interaction of Magnesium-Based Materials with Human Blood Cells and Culture of Human Diploid Cells In Vitro. *Bull Exp Biol Med*. 2019 Nov;168(1):160-167. doi: 10.1007/s10517-019-04668-w

7. Makarov MS, Storozheva MV, Borovkova NV, Ponomarev IN. Growth-Stimulating Effect of Platelet Preparations Obtained by Different Methods on Human Fibroblast Culture. *Bull Exp Biol Med*. 2022 Nov;174(1):159-163

8. Borovkova NV, Makarov MS, Ponomarev IN, Andreev YV, Storozheva MV, Budaev AA. Experimental Study of the Effect of Biological Matrixes with Stabilized and Non-Stabilized Platelets on Reparative Process in the Wound Equivalent to Deep Burn. *Bull Exp Biol Med*. 2020 Nov;170(1):128-134. doi: 10.1007/s10517-020-05019-w.

9. Makarov MS, Storozheva MV. Regulation of Human Platelet Adhesion with Ascorbic Acid. *Bull Exp Biol Med*. 2022 Dec;174(2):280-282. doi: 10.1007/s10517-023-05690-9

10. Makarov MS, Storozheva MV. Morphofunctional Properties of Human Platelets, Treated with Low Doses of Hydrogen Peroxide. *Journal of Biosciences and Medicines*. –2020. –Vol.8, № 9. –P. 125-130. DOI: 10.4236/jbm.2020.89010

11. Боровкова Н.В., Макаров М.С., Андреев Ю.В., Сторожева М.В., Пономарев И.Н. Оценка цитокинового состава сыворотки крови и препаратов на основе тромбоцитов человека. *Молекулярная медицина*. 2021;19(3): 51-57. DOI: <https://doi.org/10.29296/24999490-2021-03-08>

12. Makarov MS Morphofunctional Properties of Spindle-Shaped Platelets. *Bull Exp Biol Med*. 2023 Mar;174(5):681-684. doi: 10.1007/s10517-023-05769-3.

Недостовверные сведения об опубликованных соискателем работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации, в работе отсутствуют.

На автореферат поступили отзывы от доктора биологических наук, профессора, заведующего лабораторией генетики стволовых клеток Медико-генетический научного центра имени академика Н.П. Бочкова Гольдштейна Дмитрия Вадимовича, доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой трансфузиологии и проблем переливания крови Института усовершенствования врачей, кафедра трансфузиологии Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова Жибурта Евгения Борисовича, доктора биологических наук, профессора, директора Автономной некоммерческой организации «Институт медико-биологических исследований и технологий» Севастьянова Виктора Ивановича, доктора биологических наук, заведующего лабораторией биохимии двигательных систем отдела функциональной биохимии биополимеров ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Силачева Дениса Николаевича.

Отзывы положительные, критических замечаний в отзывах по представленной работе нет. Отзывы содержат информацию об актуальности настоящего исследования, новизне полученных результатов и их значимости для науки и практики. Отмечено, что диссертационная работа выполнена на высоком научном уровне, выводы диссертации обоснованы и полностью отражают полученные результаты.

Выбор Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Московский научный исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена Министерства здравоохранения Российской Федерации в качестве ведущей организации обоснован тем, что в отделении прогноза эффективности

лечения в течение многих лет проводятся исследования по использованию тромбоцитных препаратов для стимуляции роста клеток человека при создании биологических конструкций с использованием лизата тромбоцитов в регенеративной медицине.

Выбор оппонентов обоснован тем, что: 1. Ельчанинов Андрей Владимирович – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией роста и развития Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» занимается изучением рост-стимулирующего и репаративного эффекта тромбоцитов при лечении экспериментальных ран, а также разработкой тканеинженерных конструкций для использования в регенеративной медицине, 2. Ройтман Евгений Витальевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой онкологии, гематологии и лучевой терапии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова занимается изучением функциональной организации тромбоцитов человека в норме и при различных патологиях, а также изучением способов регуляции активности тромбоцитов, 3. Яцковский Александр Никодимович – доктор медицинских наук, профессор, профессор по кафедре анатомии и гистологии человека ФГАОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» МЗ РФ является автором научных публикаций по изучению структурно-функциональной организации клеток крови, подверженных различным воздействиям.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных автором исследований морфофункциональных особенностей тромбоцитов человека, биологической активности тромбоцитов под действием разных факторов и биологического эффекта тромбоцитных препаратов *in vivo* и *in vitro* разработаны положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, заключающееся в фундаментальном и практическом обосновании возможности использования

регенеративного потенциала тромбоцитов на основе данных, полученных в ходе морфофункционального анализа тромбоцитов человека, регуляции активности тромбоцитов, получения тромбоцитных препаратов, обладающих определенным цитокиновым составом и биологическим эффектом, возможности использования тромбоцитов для стимуляции роста клеток в культуре и для лечения тканевых дефектов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что были получены научные результаты, свидетельствующие о ранее неизвестных морфофункциональных особенностях тромбоцитов, которые могут влиять на реализацию репаративного и регенеративного потенциала тромбоцитов. Установлены принципы использования морфофункциональных методик, основанных на витальном окрашивании клеток, для оценки суммарного биологического потенциала тромбоцитарного пула. Определены формы биологической активности, которые тромбоциты человека проявляют при действии неканонических факторов активации. Впервые показана возможность активации тромбоцитов с помощью диметилсульфоксида, редокс-потенциала среды, низкоимпульсного лазерного излучения. Полученные данные расширяют представление о механизмах экзоцитоза тромбоцитных гранул и его взаимосвязи с проявлением тромбоцитами адгезивной активности. Впервые показано влияние наночастиц серебра на процессы адгезии и дегрануляции тромбоцитов, показана принципиальная возможность селективной дегрануляции тромбоцитов человека в условиях *in vitro* и возможность получения на основе тромбоцитов препаратов с определенным цитокиновым составом. Тромбоцитарные гранулы могут быть сохранены в адгезирующих тромбоцитах с помощью препарата тикагрелора, низких доз наночастиц серебра, перекиси водорода и аскорбиновой кислоты. В культуре клеток факторы, выделенные из тромбоцитов, и тромбоцитные препараты способны как стимулировать, так и подавлять пролиферативную активность. Насыщение тромбоцитами коллагеновых матриц в условиях оптимальной дозы тромбоцитов заметно повышает пролиферативную и

миграционную активность клеток на коллагене без нарушения структурной целостности клеток. Анализ автофлуоресценции коллагена позволяет оценить структуры коллагеновых волокон в гистологических препаратах и тканевых трансплантатах. Использование коллагеновых матриц, насыщенных тромбоцитами, стимулирует репаративные и регенеративные процессы у животных с экспериментальным ожогом и глубокой механической раной.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследований: культуральных, биохимических, гематологических, микроскопии, мультиплексного анализа, а также проведен адекватный анализ, обобщение и статистическая обработка данных.

Изложены доказательства того, что морфофункциональный статус тромбоцитов имеет высокую вариабельность во всех гендерно-возрастных группах доноров. У здоровых людей тромбоциты с гранулами имеют неоднородность по скорости функционального ответа. Среди биологически полноценных тромбоцитов существует субпопуляция тромбоцитов, склонных к быстрой дегрануляции. Тромбоциты человека *in vitro* проявляют биологическую активность и дегранулируют под действием высоких концентраций диметилсульфоксида, перекиси водорода, аскорбиновой кислоты и наночастиц серебра, в условиях гипотонии, в условиях редокс-потенциала среды -100мВ и ниже, при воздействии низкоимпульсного лазерного света в ультрафиолетовом и красном диапазоне. Регуляция адгезивной активности тромбоцитов позволяет снизить экзоцитоз тромбоцитарных гранул в отсутствие полной инактивации тромбоцитов. Тромбоцитарные гранулы могут быть стабилизированы в адгезирующих тромбоцитах с помощью тикагрелора, низких доз наночастиц серебра, перекиси водорода и аскорбиновой кислоты. При воздействии разных концентраций наносеребра в тромбоцитах сохраняется разный объем ростовых факторов. Цитокиновый состав тромбоцитных препаратов и их

рост-стимулирующий эффект заметно различаются в зависимости от типа препарата. В присутствии тромбоцитарных препаратов *in vitro* увеличивается пролиферативная и миграционная активность диплоидных клеток человека, культивируемых на коллагеновых матриксах. Коллагеновые матрицы, насыщенные тромбоцитами, ускоряют репаративные процессы в коже, стимулируют рост сосудов и эпителизацию.

Значение полученных соискателем результатов фундаментального исследования для практики подтверждается проведенным исследованием биологической активности тромбоцитарных препаратов в культуре клеток человека и на экспериментальных животных. Установлены режимы центрифугирования, при которых морфофункциональный статус тромбоцитов не претерпевает изменений, показано влияние режимов ускорения свыше 1000 g на качество тромбоцитов. Разработан способ получения лизата тромбоцитов с высоким содержанием факторов роста и низким содержанием провоспалительных цитокинов. Показана возможность оценки цитокинового состава тромбоцитарных препаратов с помощью морфофункционального исследования тромбоцитов в исходной пробе. Установлены факторы, которые влияют на пролиферацию и жизнеспособность диплоидных клеток *in vitro* в присутствии компонентов тромбоцитов. Разработаны методики активации тромбоцитов без использования стандартных индукторов, установлена возможность получения при 20-22°C тромбофибринового сгустка с ростовыми факторами. Методика оценки автофлуоресценции коллагена позволяет оценить компактизацию и структурную целостность коллагеновых волокон. Разработан способ получения бесплазменного тромбоцитарного лизата с высоким содержанием ростовых факторов, предложены подходы к насыщению коллагеновых матриц ростовыми факторами в составе тромбоцитов.

Оценка достоверности результатов работы выявила, что результаты получены на современном сертифицированном оборудовании с

использованием обширного комплекса современных методов исследования и статистического анализа, корректных положительных и отрицательных контролей, достаточного количества исследованного материала. Обоснованность научных положений и выводов подтверждена критической оценкой результатов исследования при сравнении с данными современной научной литературы. **Теория** исследования построена на известных данных о регенеративном потенциале тромбоцитов, реализация которого зависит от проявления функциональной активности тромбоцитов и их структурных особенностей. **Идея исследования базируется** на комплексном анализе морфофункциональных характеристик тромбоцитов, подверженных различным воздействиям с участием агонистов активации, физических и химических факторов, с целью выявления особенностей тромбоцитов, которые имеют значение для стимуляции роста и миграции клеток, стимуляции репаративных и регенеративных процессов заживления ран. **Использовано сравнение** собственных результатов и данных, полученных другими исследователями, по вопросам исследования тромбоцитов человека в присутствии наночастиц серебра, оценки уровня факторов роста и других биологически активных веществ в составе тромбоцитных препаратов, исследования рост-стимулирующего эффекта тромбоцитов и их компонентов *in vitro* и *in vivo*. **Установлено совпадение с данными литературы части полученных результатов**, в частности о сходном эффекте влияния высоких концентраций перекиси водорода и гипотонии на функциональную активность тромбоцитов человека, влияния малых концентраций наночастиц серебра на адгезивную активность тромбоцитов человека, по стимуляции роста грануляционной ткани под действием тромбоцитных препаратов у экспериментальных животных с механической раной. **Использованы** репрезентативные группы доноров тромбоцитов и экспериментальных животных, современные, адекватные поставленным задачам методы исследования и обработки результатов. **Личное участие автора** заключалось в определении задач исследования, планировании, организации и проведении

экспериментов, получении и анализе научных данных, их статистической обработке, оформлении результатов в виде публикаций и научных докладов.

В ходе защиты диссертации критических замечаний высказано не было. Соискатель Макаров М.С. ответил на все задаваемые в ходе заседания вопросы.

На заседании 01 июня 2023 г. диссертационный совет принял решение за исследования морфофункциональных особенностей тромбоцитов человека, их биологической активности при воздействии разных факторов и биологического эффекта тромбоцитных препаратов *in vivo* и *in vitro*, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, заключающееся в фундаментальном и практическом обосновании возможности использования регенеративного потенциала тромбоцитов для стимуляции роста клеток в культуре и для лечения тканевых дефектов присудить Макарову М.С. ученую степень доктора биологических наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 6 докторов наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали: за - 18, против - 0, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета 24.1.204.02

член-корр. РАН, профессор, д.м.н.



Л.М. Михалева

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.204.02

д.б.н.

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to A.M. Kosyrev.

А.М. Косырева

«02» июня 2023 г.