

ОТЗЫВ

официального оппонента

**доктора медицинских наук, профессора Жибурта Евгения Борисовича
на диссертацию Кищенко Василия Васильевича «Лабораторные маркеры оценки
функциональной активности тромбоцитов при хранении тромбоцитного
концентрата», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских
наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика**

Актуальность темы исследования

Переливание тромбоцитов повсеместно используется во время операций и химиотерапии, а также для пациентов с нарушениями свертываемости крови. Тромбоциты содержат в высоких концентрациях ростовые факторы и другие биологические активные молекулы, такие как малые регуляторные микроРНК. Тромбоцитарные микровезикулы, образующиеся при активации клеток, выступают переносчиками таких активных молекул. Сфера применения концентрата тромбоцитов постоянно расширяется. При этом сроки хранения тромбоцитных концентратов ограничены и составляют от 3 до 7 дней.

Количество, качество и продолжительность жизни тромбоцитов являются тремя важными факторами в физиологии, патологии и переливании тромбоцитов. В настоящее время не предложено единого лабораторного теста по оценке функциональной активности и жизнеспособности тромбоцитов в получаемых концентратах до момента переливания реципиенту. Однако потребность в простом, экономически обоснованном и чувствительном тесте или комбинации тестов, которые позволят контролировать качество переливаемых тромбоцитных концентратов, существует. Явление повреждения тромбоцитов при хранении связано с морфологическими, биохимическими и функциональными изменениями клеток, молекулярные механизмы регуляции которых, в настоящее время до конца не изучены.

Таким образом, работа Кищенко В.В., посвященная поискам лабораторных маркеров оценки активности клеток и качества тромбоцитного концентрата при хранении является актуальной, соответствует мировым исследованиям в области физиологии и биологии тромбоцитов

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

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе, обеспечивается высоким методическим уровнем выполненных исследований, опирается на современную методологию и

технологии молекулярно-биологических, генетических и клинико-лабораторных исследований. Кищенко В.В. соблюдены все правила научных исследований и принципы биоэтики. Полученные результаты исследования отвечают современным взглядам на изучаемую проблему и согласуются с отечественными и зарубежными публикациями по данной тематике, что полно отражено в литературном обзоре и обсуждении результатов.

Достоверность и новизна

Научная новизна проведенного исследования не вызывает сомнений. Автором впервые оценены процессы микровезикуляции в тромбоцитах при хранении тромбоцитного концентрата современными лабораторными методами – сканирующая электронная микроскопия низкого напряжения, высокочувствительная проточная цитометрия, динамическое рассеяние света. Впервые оценено изменение 12 микроРНК при хранении тромбоцитного концентрата, в том числе количественное распределение данных регуляторных молекул между клетками, везикулами и экзосомами.

Несомненной новизной исследования является не только визуализация процессов образования внеклеточных везикул с помощью сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения, комплексная характеристика фракций тромбоцитного концентрата на разных этапах хранения, количественная оценка тромбоцитарных микроРНК, но и предложенный алгоритм оценки качества тромбоцитных концентратов на основе проточной цитометрии.

Все исследования проведены на достаточном количестве образцов. Статистическая обработка полученных результатов проведена грамотно и корректно, применяемые методы статистического анализа полностью соответствуют поставленным задачам. Все вышеперечисленное позволяет сделать заключение о высокой достоверности полученных данных.

Теоретическая и практическая значимость

Работа Кищенко В.В. выполнена с использованием современных, высокотехнологичных методов и подходов клинической лабораторной диагностики, молекулярной биологии и генетики. Комплексный анализ тромбоцитного концентрата в течение срока хранения с оценкой функциональной активности клеток, их морфологических изменений, анализ отделяемых внеклеточных микровезикул и экзосом, определение микроРНК, регулирующих экспрессию генов и передачу сигналов в клетках, показывает большое значение проведенного исследования для понимания фундаментальных механизмов активации тромбоцитов, процессов микровезикуляции, регуляции апоптоза, синтеза и секреции регуляторных микроРНК.

Полученные в диссертационной работе Кишенко В.В. результаты позволили сформулировать протокол оценки качества тромбоцитного концентрата, основанный на количественной характеристике микровезикул с помощью высокочувствительной проточной цитометрии.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что работа Кишенко В.В. имеет большое практическое значение для клинической лабораторной диагностики, гематологии и трансфузиологии, а также фундаментальное значение в понимании молекулярно-биологических и генетических механизмов активации тромбоцитов и их апоптоза.

Общая характеристика работы

Диссертация построена традиционным образом, включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», «Практические рекомендации», «Перспективы дальнейшей разработки темы», «Список сокращений» и «Список литературы», включающий 160 источников, из них 17 отечественных и 143 зарубежных. Диссертация изложена на 132 страницах, содержит 2 таблицы и 32 рисунка, которые позволяют наглядно представить полученные научные результаты. Список сокращений содержит расшифровку всех используемых в работе аббревиатур.

Во «Введении» дано описание проблематики и её актуальность, сформулированы цели и задачи исследования, дана оценка степени новизны результатов работы, их теоретической и практической значимости.

В «Обзоре литературы» Кишенко В.В. подробно описывает физиологию и биологию тромбоцитов, технологические подходы в приготовлении тромбоцитных концентратов, предлагаемые в различные исторические периоды способы оценки качества тромбоцитных концентратов, клинические проблемы при трансфузии тромбоцитных концентратов реципиентам с различной клинической картиной.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание используемых методик, что позволяет не только оценить их пригодность для решения поставленных в работе задач, но и воспроизвести эксперименты.

Глава «Результаты» состоит из 7 подразделов, которые подробно описывают морфологические признаки активации и везикуляции тромбоцитов при хранении, оценку тромбоцитного концентрата методом сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения, анализ фракций внеклеточных микровезикул и экзосом, полученных с помощью дифференциального центрифугирования тромбоцитных концентратов, методом динамического рассеяния света. Также подразделы главы «Результаты» описывают эксперименты по анализу количества микроРНК и белковому составу фракций

тромбоцитного концентрата, содержащих клетки, внеклеточные микровезикулы и экзосомы. 7-ой подраздел главы «Результаты» посвящен описанию оригинального протокола оценки везикуляции в тромбоцитном концентрате, который может быть использован в клинической практике.

Раздел «Обсуждение» подводит итог проведенному исследованию, дает сравнение полученных данных с результатами других исследований, в том числе зарубежных. Анализ данного раздела позволяет сделать заключение о соответствии полученных результатов мировому уровню и подчеркивает их оригинальность.

Выводы и положения, выносимые на защиту, сформулированы четко, соответствуют задачам исследования, отражают суть полученных результатов, являются обоснованными.

Материалы диссертационного исследования Кишенко Василия Васильевича являются оригинальными, в работе отсутствуют неправомерные заимствования научных результатов без ссылки на автора или источник цитирования, нет недостоверных сведений об опубликованных соискателем работах.

Диссертант непосредственно участвовал на всех этапах проведения исследования. Под руководством научного руководителя были сформулированы цель и задачи, а также разработан дизайн исследования. Подбор и анализ зарубежных и отечественных литературных источников и нормативных документов по теме диссертационного исследования, проведение лабораторных исследований, формирование базы данных полученных результатов с последующим статистическим анализом, написание текста диссертации, подготовка публикаций и докладов по теме исследования выполнены диссертантом самостоятельно.

Содержание диссертации Кишенко В.В. соответствуют паспорту специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, в том числе п. 1 «Определение качественных и количественных характеристик морфологических, химических и других параметров биологических материалов», п. 2 «Оптимизация и разработка новых методов исследования химического и клеточного состава биоматериалов, определение требований и показаний к условиям их применения», п. 4 «Разработка методов оценки физиологических лабораторных параметров организма и состава биологических жидкостей», п. 5 «Разработка теоретической базы для поисковых диагностических программ», п. 8 «Морфологические исследования биоматериала» и п. 11 «Молекулярно-генетические методы исследований».

Диссертационная работа оформлена согласно требованиям ВАК и ГОСТ Р 7.0.11-2011. По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них статьи в

рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований и в международной базе Scopus. Результаты исследования представлены на российских и международных конгрессах и симпозиумах.

Автореферат соответствует тексту диссертации, включает все основные результаты и их интерпретацию.

Вопросы и замечания

В ходе изучения диссертационной работы Кищенко Василия Васильевича возник ряд вопросов:

- 1) Как диссертант отбирал для цитирования отечественные публикации о заготовке и переливании тромбоцитов?
- 2) Может ли в настоящее время реальная станция переливания крови в России или другой развитой стране внедрить в практическую работу положения Вывода №4 и Практической рекомендации №1?

Заданные оппонентом вопросы не умаляют значимости полученных результатов, сделанных выводов и вынесенных на защиту положений в целом, а лишь отражают важность решаемой диссертантом задачи и научный интерес к проблеме.

Заключение

Диссертация Кищенко Василия Васильевича «Лабораторные маркеры оценки функциональной активности тромбоцитов при хранении тромбоцитного концентрата», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача по определению лабораторных морфологических, иммунологических и молекулярно-генетических маркеров функционального состояния клеток в тромбоцитном концентрате для оценки его качества на разных сроках хранения, что может позволить в дальнейшем персонифицировать процесс трансфузий, оптимизировать использование тромбоцитных концентратов, повысить эффективность и безопасность использования препаратов крови, что имеет существенное значение для клинической лабораторной диагностики.

По своей актуальности, новизне, практической и теоретической значимости, методическому уровню и объему выполненных исследований диссертационная работа соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении 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, Кищенко Василий

