

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Кищенко Василия Васильевича на тему «Лабораторные маркеры оценки функциональной активности тромбоцитов при хранении тромбоцитного концентрата» представленную к защите в диссертационный совет 04.1.001.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Актуальность темы диссертации

Тема диссертационной работы Кищенко Василия Васильевича – изучение различных характеристик тромбоконцентрата, с целью оценки состояния тромбоцитов, в первую очередь их функциональной активности. Тромбоцитарный концентрат представляет собой наиболее сложный для подготовки и хранения компонент крови, используемый в трансфузионной медицине. Это обусловлено тем, что тромбоциты очень лабильны и чувствительны к любым воздействиям. Они могут активироваться и повреждаться при изменении температуры, изменении состава окружающей среды, при осаждении, даже при небольших ускорениях, и т.д. Известно, что плазму крови можно хранить в замороженном виде более года, а эритромассу более месяца при $+4-8^{\circ}$, а при заморозке в криоконсервирующих растворах также более года. В отличие от этих компонентов тромбоциты теряют свои свойства при заморозке и даже при $+4-8^{\circ}$. Их рекомендуется хранить при комнатной температуре ($22-25^{\circ}$) в присутствии глюкозы для поддержания метаболизма и при постоянном медленном перемешивания, чтобы предотвратить их склеивание при естественном осаждении. Но даже в этих условиях – время их хранения не превышает недели, т.к. в течение этого периода тромбоциты постепенно теряют активность и соответственно способность реализовывать свою главную функцию – участвовать в остановке кровотечений. Более того любые, даже минимальные, изменения и нарушения на этапах отделения тромбоцитов от других форменных элементов, их концентрирования и последующего хранения, могут привести к изменению свойств тромбоконцентрата. В связи с этим актуальным является поиск адекватных лабораторных методов для оценки качества тромбоконцентрата, а конкретно для оценки функциональной активности переливаемых тромбоцитов.

Научная и практическая значимость полученных результатов

Объектом исследования в настоящей работе служили тромбоконцентраты на разных сроках их хранения. Для их характеристик автором использовался широкий набор

современных и разнообразных методов: трансмиссионная электронная микроскопия низкого напряжения для оценки морфологии тромбоцитов и их мембранных везикул, динамическое светорассеивание для измерения размера везикул, ПЦР в реальном времени для идентификации микроРНК, электрофорез и иммуноблоттинг для характеристики белкового состава тромбоцитов и их везикул, проточная цитометрия для характеристики и измерения содержания везикул. Принципиально оригинальным подходом для изучения состояния тромбоконцетрата было выделение для анализа отдельных фракций – собственно тромбоциты (фракция Ф5 – осаждение при 5000 g), две фракции мембранных везикул – микрочастицы (фракция Ф16 – осаждение при 16000 g) и экзосомы (фракция Ф100 – осаждение при 100000 g), супернатант после всех осадений (фракция Фс). Для оценки изменений изучаемых показателей в процесс хранения тромбоконцетрата все анализы проводили на 2 и на 7 день хранения.

С помощью электронной микроскопии автором было визуально продемонстрировано, что хранение тромбоцитов сопровождается появлением в среде мембранных везикул. По мере хранения увеличивается количество активированных тромбоцитов с отростками и псевдоподиями, на концах которых, в основном, и происходит образование везикул. Также с помощью электронной микроскопии были охарактеризованы две фракции везикул и, как и следовало ожидать, микрочастицы (Ф16) имели более крупные размеры, чем экзосомы (Ф100), хотя и с некоторой взаимной контаминацией. Данные электронной микроскопии по размерам везикул были подтверждены и с помощью метода динамического светорассеивания.

Автором впервые проведен подробный количественный анализ содержания более десятка микроРНК в различных фракциях тромбоконцетрата и для некоторых из них обнаружены характерные изменения в процессе хранения. Эти данные представляют не только академический интерес в плане распределения разных микроРНК между тромбоцитами, везикулами и растворимой фазой, но и являются актуальными для характеристики тромбоконцетрата, т.к. известно, что микроРНК могут оказывать влияние на протеом и соответственно и на функциональное состояние тромбоцитов.

Также впервые с помощью электрофореза и иммуноблоттинга был проведен подробный анализ различных белков в составе фракций тромбоконцетрата и их изменения в процессе его хранения. Были проанализированы: (1) белки, участвующие в реализации функциональных реакций – P2Y₁₂рецептор АДФ и рецептор фактора Виллебранда CD42b; (2) белки апоптотических реакций тромбоцитов – каспаза 3 (неактивированная и активированная формы) и белок анионселективного канала 1 (VDAC-1); (3) белки, имеющие отношение к образованию везикул – CD9 (маркер экзосом) и TSG101 (компонент комплекса

участвующего в формировании мультивезикулярных телец из которых впоследствии образуются экзосомы) и (4) белок AGO2, участник обмена мРНК.

В последней части работы автором был выполнен с помощью проточной цитометрии подсчет тромбоцитарных везикул (маркер CD41), как во фракции микрочастиц (Ф16), так и экзосом (Ф100) в 8 отдельных образцах тромбоконцентрата. Во всех образцах на 7 день наблюдалось увеличение количества и микрочастиц и экзосом по сравнению со 2 днем, что подтверждает данные электронной микроскопии и четко указывает на увеличение образования тромбоцитарных везикул в процессе хранения тромбоцитов. Не менее важным был и существенный разброс между отдельными тромбоконцентратами по количеству везикул. На основании полученных данных автором было предложено использовать подсчет микрочастиц, которые более просты для выделения, чем экзосомы (не требует высокооборотного центрифугирования) для оценки качества тромбоцитов в тромбоконцентрате. Разработанный протокол предлагается для его дальнейшей апробации в реальной трансфузионной практике с целью выяснения корреляций между уровнем микрочастиц в тромбоконцентрате и эффективностью трансфузии тромбоцитов (оценка времени жизни тромбоцитов и купирования кровотечений).

Совокупность результатов, полученных автором при изучении разнообразных показателей для характеристики тромбоконцентрата и с использованием ряда новых методических подходов, безусловно являются достаточными для диссертационной работы на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Проведенный в работе подбор лабораторных методов для оценки качества переливаемых тромбоцитов соответствует заявленной специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов

Обоснованность и достоверность полученных результатов определяются адекватностью поставленным задачам и информативностью используемых методов, включая сканирующую электронную микроскопию, динамическое светорассеивание, ПЦР в реальном времени, электрофорез и иммуноблоттинг, и проточную цитометрию. Все результаты были получены на достаточном количестве проанализированных образцов тромбоконцентрата и были корректно статистически обработаны.

Научная новизна полученных результатов

Автором впервые были проведены подробные исследования тромбоцитарных везикул в тромбоконцентрате. В ходе анализа отдельно были рассмотрены две фракции везикул – микрочастицы и экзосомы. Выполнена визуализация везикул с помощью сканирующей электронной микроскопии, измерения их размера с помощью сканирующей электронной микроскопии и с помощью метода динамического светорассеивания,

охарактеризованы ассоциированные с везикулами микроРНК, с помощью электрофореза и иммуноблоттинга определены главные белки, входящие в состав везикул, и проведен подсчет везикул с помощью проточной цитометрии. Более того, впервые продемонстрировано, как исследуемые характеристики меняются в процессе хранения тромбоконцентрата.

Впервые для оценки качества тромбоконцентрата в реальной лабораторной практике предложен метод, основанный на подсчете микрочастиц тромбоцитов с помощью проточной цитометрии.

Общая характеристика, структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 132 страницах, содержит 2 таблицы и 32 рисунков, построена по традиционному принципу и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», «Практические рекомендации», «Перспективы дальнейшей разработки темы», «Список сокращений» и «Список литературы».

Обзор литературы полностью соответствует тематике работы – вопросам получения, хранения и оценки качества тромбоконцентрата. В отдельных разделах в соответствии с теми методическими подходами, которые применяются автором, рассмотрены характеристики микроРНК тромбоцитов и тромбоцитарных мембранных везикул. Материал обзора логически обосновывает актуальность предлагаемого исследования, обусловленную недостаточностью разработки методов оценки функции тромбоцитов в тромбоконцентрате. Список цитируемой литературы содержит 160 источников и включает основные работы по теме, как отечественных, так и зарубежных авторов. Материалы и методы изложены достаточно подробно, так что большинство методик может быть воспроизведено по представленному описанию. Результаты представлены логично и хорошо иллюстрированы. Особо следует отметить высококачественные изображения, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии. Все результаты подробно обсуждены с учетом ранее опубликованных работ других авторов. В разделе «Практические рекомендации» представлены возможности использования разработанного метода измерения тромбоцитарных микрочастиц для оценки качества тромбоконцентрата, а в разделе «Перспективы дальнейшей разработки темы» указано, каким образом нужно провести апробацию этого метода, чтобы он нашел обоснованное применение в реальной лабораторно-клинической практике. Выводы по работе полностью соответствуют полученным результатам. Диссертация написана хорошим языком, текст очень хорошо выверен и практически не содержит стилистических неточностей и опечаток.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 6 статей, из них 4 в изданиях из списка ВАК, включая такие рейтинговые журналы, как «Platelets» и «Цитология», и 14 тезисов докладов на отечественных и международных конференциях.

Замечания и вопросы

По работе имеются вопросы и замечания, которые носят дискуссионный или формальный характер и не снижают научную ценность и достоверность полученных результатов:

1. В разделе 3.5. «Белковый состав фракций тромбоцитного концентрата» не указано количество тромбоконцентратов, проанализированных с помощью электрофореза и иммуноблотинга, что не позволяет оценить системность и достоверность полученных результатов.
2. В этом же разделе 3.5 автором почему-то не проводилось исследование белка CD41, компонента комплекса CD41/CD61(гликопротеин IIb-IIIa), главного белка мембраны тромбоцитов, служащего рецептора фибриногена и опосредующего агрегацию тромбоцитов. Следует отметить, что именно этот белок был использован в качестве маркера и микрочастиц и экзосом при их анализе с помощью проточной цитометрии. Считает ли автор, что этот белок также было целесообразно оценить с точки зрения его перераспределения между фракциями тромбоконцентрата в процессе хранения?

Имеются также вопросы дискуссионного характера по интерпретации результатов:

1. Как по мнению автора можно объяснить появление жирной полосы на электрофорезе с мол. массой близкой к альбумину и присутствующей в супернатанте (Фс), во фракции тромбоцитов (Ф5) и микрочастиц (Ф16) на 7 день хранения? (см. рис. 21)
2. CD42b снижается на 7 день в тромбоцитах по-видимому за счет протеолитического «шеддинга». Но как, по мнению, CD42b попадает на 7 день в экзосомы (фракция Ф100) и почему не в супернатант (фракция Фс)? (см. рис. 22)
3. Почему по мнению автора активированная каспаза содержится в большом количестве в экзосомах (фракция Ф100) и уже на второй день, когда апоптоз тромбоцитов еще по сути не запущен? И почему ее гораздо меньше в экзосомах (фракция Ф100) на 7 день? (см. рис. 22)

Заключение

Диссертация Кищенко Василия Васильевича на тему «Лабораторные маркеры оценки функциональной активности тромбоцитов при хранении тромбоцитного концентрата» является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой была решена актуальная практическая, клинически ориентированная задача по подбору методов для характеристики тромбоцитарного концентрата. Предложенный

автором метод подсчета тромбоцитарных микрочастиц может быть в дальнейшем использован для оценки качества переливаемых тромбоцитов, что отвечает стратегическим задачам развития здравоохранения Российской Федерации и имеет существенное значение для клинической лабораторной диагностики.

По своей актуальности, новизне, практической и теоретической значимости, методическому уровню и объему выполненных исследований 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 Василия Васильевича, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник

Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова», Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор медицинских наук,
профессор



Мазуров Алексей Владимирович

«28» апреля 2026 г.

Адрес: 121552 Москва, ул. Академика Чазова, д. 15а
Контактные телефоны: +7 (916) 6270543 (моб); +7 (495) 4146735 (раб)
Электронный адрес: avmazurov@list.ru

Подпись Мазурова Алексея Владимировича заверяю.

Ученый секретарь Института экспериментальной кардиологии
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Д.М.Н.

Плеханова Ольга Сергеевна

