

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Макарова Максима Сергеевича

**на тему: «Биологические основы реализации регенеративного
потенциала тромбоцитов человека», представленную на соискание
ученой степени доктора биологических наук по специальности
1.5.22 - Клеточная биология**

Актуальность избранной темы исследования

Регенерация представляется собой уникальное свойство всех живых организмов. При этом способность к восстановлению поврежденных тканей и органов выражена неодинаково у различных представителей животного мира. Характерной чертой репаративной регенерации у млекопитающих является быстрое формирование рубца в области повреждения без восстановления нормального строения, что представляет большую проблему. Таким образом, стимуляция восстановления исходной структуры в области повреждения без чрезмерного формирования соединительной ткани является актуальной задачей.

Одним из возможных способов стимуляции органотипической репаративной регенерации является применение клеточной терапии. Использование различных клеточных продуктов основано на способности тех или иных клеток секретировать широкий спектр биологически активных веществ. В связи с этим все большее внимание привлекают кровяные пластинки, которые также способны секретировать множество цитокинов и факторов роста.

В настоящее время идет активный поиск эффективных препаратов на основе тромбоцитов человека для решения различных задач регенеративной медицины. Существует множество работ в этой области, при этом упор делается на оценке конечного биологического или клинического эффекта тромбоцитных препаратов, без учета качества исходных тромбоцитов. Тромбоциты человека в различных условиях

могут по-разному реализовать свой биологический потенциал. В связи с этим является актуальным выявление и оценка тех биологических характеристик тромбоцитов, которые могут иметь большое значение при подготовке тромбоцитов к использованию в регенеративной медицине, разработка новых подходов к стимуляции активности тромбоцитов и, одновременно, к регуляции их активности.

Указанные проблемы в той или иной степени решаются в диссертационной работе Макаровым М.С., что и определяет высокую актуальность проведенного исследования.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором дана комплексная характеристика тромбоцитов, особенностей их активации при различных воздействиях, а также способность стимулировать пролиферацию клеток в культуре, а также репаративную регенерацию кожи у экспериментальных животных.

Макаров М.С. впервые показал, что тромбоциты крови здоровых доноров имеют высокую вариабельность по своим морфофункциональным показателям. Показано, что 10-12% тромбоцитов имеют высокую чувствительность к фактору активации АДФ. Отмечено, что в крови присутствует 3 субпопуляции тромбоцитов, различающихся интенсивностью формированию ламеллы. При этом количество тромбоцитов, способных к быстрой дегрануляции без интенсивного форсирования ламеллоподий колеблется от 8% до 40%. Впервые четко установлены условия активации и дегрануляции тромбоцитов *in vitro*: концентрация ДМСО, раствора хлорида натрия, перекиси водорода, аскорбиновой кислоты, наночастиц серебра длительность воздействия УФ-облучения и красного света. При этом указанные факторы способны и останавливать дегрануляцию тромбоцитов, что зависит от концентрации воздействующих веществ. Установлено, что наночастицы серебра в зависимости от используемой концентрации могут избирательно

стабилизировать гранулы тромбоцитов. Для сохранения факторов FGF-2, TGF- α , PDGF в тромбоцитах наиболее эффективна концентрация 2,5 мкМ наносеребра, для сохранения EGF и VEGF – 1,25 мкМ наносеребра.

Автором установлено, что факторы роста могут быть получены как в составе бедной, так и богатой тромбоцитами плазме, предварительное отмывание тромбоцитов от плазмы позволяет получить лизат, в котором уровень факторов роста повышен в 2-5 раза. Выявлена корреляционная связь между уровнем EGF и PDGF, между уровнем VEGF и TNF- α . Помимо факторов химической природы температура также оказывает влияние на активность получаемых из тромбоконцентратов тромбофибриновых сгустков. Впервые показано, что тромбофибриновые сгустки, полученные при 20-22 °С, обладают более высокими рост-стимулирующими свойствами по сравнению со сгустками, выделенными при 37°С. Несмотря на способность стимулировать пролиферацию клеток в культуре, высокие концентрации лизата тромбоцитов способны ингибировать данный процесс. В связи с этим в случае практического использования тромбоцитов в рамках регенеративной медицины необходимо предварительно усыновить оптимальную концентрацию препарата.

В серии экспериментов автором установлено стимулирующие влияние коллагеновых матриксов, насыщенных тромбоцитами, на заживление ожогов и механических ран кожи у лабораторных животных. Показано стимулирующее влияние на восстановление эпителиального покрова, рост сосудов и кожных дериватов.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Полученные Макаровым М.С. данные значительно расширяют представление о морфофункциональных свойствах тромбоцитов человека. В работе установлены принципы использования морфофункциональных

методик, основанных на витальном окрашивании клеток, для оценки суммарного биологического потенциала тромбоцитарного пула. Изучены морфофункциональные свойства тромбоцитов человека при действии неканонических факторов активации. Полученные данные расширяют представление о механизмах секреции тромбоцитных гранул. Показана возможность оценки цитокинового состава тромбоцитных препаратов с помощью морфофункционального исследования тромбоцитов до проведения всех обработок. Установлены факторы, которые влияют на пролиферацию и жизнеспособность диплоидных клеток *in vitro* в присутствии тромбоцитных компонентов. Изучено влияние разных режимов центрифугирования на качество тромбоцитов. Разработан способ получения при 20-22°C тромбофибринового сгустка, обладающего рост-стимулирующим эффектом, разработан способ получения бесплазменного тромбоцитарного лизата с высоким содержанием ростовых факторов, разработаны подходы к насыщению коллагеновых матрицсов ростовыми факторами в составе тромбоцитов.

Полученные данные необходимо учитывать при создании перевязочных материалов и раневых покрытий, содержащих тромбоциты и тромбоцитарный лизат, для стимуляции репаративного процесса при повреждении кожи, а также слизистых оболочек.

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

Диссертационное исследование основано на исследовании морфофункциональных особенностей тромбоцитов 320 доноров компонентов крови, 10 здоровых добровольцев, 80 аферезных тромбоцитных концентратов. Полученный материал был исследован с помощью комплекса современных молекулярных, цитологических и гистологических методов. В работе были использованы методики витального окрашивания клеток, световой и флуоресцентной микроскопии, морфометрии, цитометрии, иммуноцитохимии. Автор

изучал биологическую активность тромбоцитов при действии различных физических и химических факторов, цитокиновый состав тромбоцитных препаратов, воздействие тромбоцитных препаратов на культуру клеток, влияние тромбоцитных препаратов *in vivo* на модели экспериментального ожога IIIa степени и глубокой раны у мышей линии Balb/c. Кроме того, в работе исследована структурная целостность коллагена в составе коллагеновых матриксов и тканевых трансплантатов, которые могут быть использованы в качестве раневых покрытий. Достоинством работы является исследование большого числа морфологических параметров тромбоцитов, которые имеют значение для оценки степени активации тромбоцитов, интенсивности адгезии, возможности регулировать активность тромбоцитов. Вся совокупность полученных данных проанализирована адекватными статистическими методами.

Таким образом, степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций не вызывает сомнений, так как в работе последовательно и логично изложены задачи исследования, которые успешно решены с использованием комплекса современных методов, достаточным объемом данных для каждой экспериментальной группы и количеством групп сравнения, адекватным применением методов статистического анализа, критической оценкой полученных результатов при сравнении их с данными современной литературы. Сформулированные автором выводы достоверны и логично следуют из результатов, полученных в ходе исследования.

Личное участие автора заключается в формулировании концепции и дизайн диссертационного исследования, формулировании цели и задач. Автором лично проведены все экспериментальные исследования, проанализированы полученные данные, сформулированы выводы.

Материалы диссертационного исследования полностью отражены в 69 работах, включая 30 статей, из них 25 – в журналах, рекомендованных ВАК, 12 – в журналах Web of Science, 10 – в журналах Scopus, тезисы 35

докладов на научно-практических конференциях и конгрессах, 3 патента на изобретение, 1 методические рекомендации.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные результаты исследования по строению и активации тромбоцитов человека могут быть включены в курс цитологии и гистологии, физиологии медицинских и биологических вузов. Данные о стимулирующем влиянии тромбоцитов и препаратов, полученных на их основе, могут быть использованы в фармацевтическом и биотехнологическом производстве при создании перевязочного материала и раневых покрытий.

Замечания

1. Глава 1. «Обзор литературы» начинается с утверждения, что «тромбоциты человека представляют собой уникальные клетки...». Несмотря на то, что международная гистологическая номенклатура допускает использование термина «тромбоцит», с утверждением, что это клетка трудно согласится.
2. Неясно, почему автор постоянно подчеркивает, что *in vitro* часть была выполнена именно с диплоидными клетками. В работе автор использовал культуру фибробластов и ММСК человека. Автор не изучал их плоидность. Несмотря на то, что среди фибробластов и ММСК доля полиплоидных клеток низка, согласится с тем, что вся их совокупность представлена только диплоидными клетками нельзя.
3. На основе данных о влиянии коллагеновых матриц с тромбоцитами на течение раневого процесса и репарации кожи после ожога и механической травмы, автор приходит к выводу о стимуляции формированию кожных дериватов в области повреждения. На мой взгляд, это утверждение недостаточно

доказано. Особенностью течения раневого процесса в коже у крысы является выраженная фаза контракции благодаря наличию развитой подкожной мышце. В связи с этим, часто в область раны смещаются волосы, сальные и потовые железы из интактной зоны.

Высказанные замечания носят рекомендательный характер, их целесообразно учесть при дальнейшей работе по данному направлению, и они не влияют на общую положительную оценку представленного диссертационного исследования.

Заключение

Диссертационная работа Макарова Максима Сергеевича на тему «Биологические основы реализации регенеративного потенциала тромбоцитов человека», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология, является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, заключающееся в получении новых данных о морфофункциональных и других биологических особенностях тромбоцитов, которые влияют на реализацию их регенеративного потенциала. Результаты проведенных исследований вносят вклад в понимание общих закономерностей функционирования тромбоцитов, что может составить основу для разработки принципиально новых подходов к созданию биологически активных препаратов, использованию тромбоцитов и их компонентов для лечения тканевых дефектов. Полученные результаты имеют большое значение для клеточной биологии, гематологии и трансфузиологии, регенеративной медицины.

По актуальности темы исследования, научному и методическому уровню, теоретической и практической значимости и достоверности полученных результатов диссертация Макарова Максим Сергеевича

соответствует требованиям пп.9 - 14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 в редакции от 28.08.2017 №1024), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.22– Клеточная биология, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.22– Клеточная биология.

Доктор медицинских наук (по специальности 03.03.04 (1.5.22.) – гистология, цитология, клеточная биология, медицинские науки)

Заведующий лабораторией роста и развития
НИИ морфологии человека имени академика
А.П. Авцына

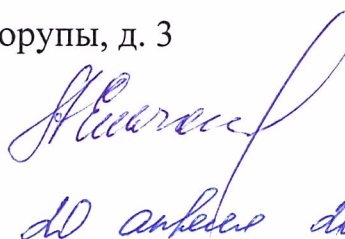
ФГБНУ «РНЦХ имени академика

Б.В. Петровского»

117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3

8(916)888-52-92,

elchandrey@yandex.ru



Handwritten signature in blue ink, appearing to read 'А.В. Ельчанинов'.

Ельчанинов
Владимирович

Андрей

Подпись д.м.н. Ельчанинова А.В. заверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ «РНЦХ имени академика Б.В. Петровского»
доцент, к.м.н.



Михайлова Анна Андреевна