

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»

Д.М.Н.

И.В. Парамонов

« 16 »

2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости диссертации
Полохова Дмитрия Михайловича
на тему «**Диагностика нарушений функций тромбоцитов у детей с использованием метода проточной цитометрии**»,
представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
по специальности **3.1.28. Гематология и переливание крови**

Актуальность темы выполненной работы

Диагностика тромбоцитопатий представляет собой длительный многоступенчатый процесс, занимающий иногда весьма длительное время. Значительной части пациентов с подозрением на наследственное или приобретенное нарушение тромбоцитов не удается установить диагноз даже после всестороннего лабораторного обследования. Наследственные заболевания тромбоцитов (НЗТ) являются гетерогенными по степени тяжести, механизмам возникновения, распространённости. Лишь при немногих из них выявлена генетическая составляющая. Многие лабораторные методы, используемые для оценки функций тромбоцитов, недостаточно стандартизированы и технически сложны. Весь спектр лабораторных тестов, предложенных для диагностики НЗТ, не доступен в большинстве лабораторий, особенно это касается молекулярно-генетических исследований, например, секвенирования следующего поколения и полноэкзомного секвенирования, которые применяются в ограниченном числе специализированных центров.

Проточная цитометрия (ПЦ) является широко распространенным методом, используемым во многих лабораториях. Она может применяться для диагностики как хорошо изученных нозологий, так и для идентификации ранее не описанных расстройств функциональных особенностей тромбоцитов. Диагностический тест функциональной активности тромбоцитов (ФАТ), основанный на методе ПЦ, требует лишь 20 мкл крови для исследования, позволяет охарактеризовать состояние тромбоцитов в покое и функциональный потенциал клеток, их морфологию, способность к адгезии, агрегации, секреции гранул, прокоагулянтную активность и способность к ретракции на уровне отдельных клеток. На сегодняшний день проблема диагностики НЗТ не решена. Патогенетические механизмы нарушения функции, морфологии и количества тромбоцитов не удается идентифицировать у широкого круга пациентов с геморрагическим синдромом. Такие пациенты получают не точный диагноз, что влечёт за собой отсутствие понимания распространённости этих расстройств и невозможности разработать эффективную терапию этих заболеваний.

Предлагаемый автором тест ФАТ для диагностики дисфункции тромбоцитов, использованный у 191 пациента в возрасте от 8 мес. до 18 лет, обратившихся с жалобами на проявления геморрагического синдрома или с лабораторно выявленным изменением количества тромбоцитов, позволил охарактеризовать критерии дисфункции тромбоцитов и получить новые данные об известных НЗТ и о неклассифицированных нарушениях, что является актуальным.

Новизна исследования и полученных результатов

Диссертация представлена на 157 страницах машинописного текста и содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, главу с результатами собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, три приложения и список литературы, который включает 10 отечественных и 140 зарубежных источников. Диссертация иллюстрирована 17 таблицами и 46 рисунками.

Во введении отражена актуальность темы, определены цели и задачи исследования.

В обзоре литературы проведен анализ современных представлений о тромбоцитарном гемостазе, о состоянии проблемы классификации нарушений функций, количества тромбоцитов и лабораторных методов их исследования.

Во второй главе представлены материалы и методы исследования, включая рутинные, а также проточную цитометрию и молекулярно-генетические способы тестирования.

Обследован 191 пациент с геморрагическим синдромом или с измененным числом тромбоцитов, выявленным при лабораторном тестировании, а также 42 здоровых ребенка (в качестве группы сравнения). Для диагностики нарушений функции тромбоцитов использовали общепринятые методики, включая рутинные тесты оценки гемостаза, а также проточную цитофлуориметрию и молекулярно-генетические исследования. Статистическую обработку данных проводили с использованием общепринятых математических инструментов, соответствующих задачам исследования.

Из обследованных, 16 пациентов отнесены к группе лиц с нормоклеточными НЗТ, 25 – с нормотромбоцитопениями, 23 – с микротромбоцитопенией, 22 – с макротромбоцитопениями и 40 – с тромбоцитозами.

Для оценки морфологических характеристик тромбоцитов проведен анализ корреляционных связей размера (FSC) и гранулярности (SSC) клеток. Выявленные автором нарушения индекса FSC/SSC среди пациентов с различными тромбоцитопатиями могут указывать на отклонения размера и гранулярности тромбоцитов при различных заболеваниях в покое и изменениях, происходящих после активации.

Изучение размера и гранулярности клеток показало необходимость персонализированной оценки их изменений при активации. Для интегральной оценки эффективности механизмов изменения размера (способность к ретракции) и гранулярности (внутриклеточная архитектура и дегрануляция) тромбоцитов, автором предложены расчётные параметры FSC в покое / после активации и SSC в покое / после активации. В результате были определены пороговые значения для FSC равное 1,19, указывающее на нарушения способности к ретракции тромбоцитов и для SSC составившее 1,04. Анализ индексов FSC и SSC тромбоцитов позволил выявить пациентов с нарушением ретракции и внутриклеточной архитектуры тромбоцитов.

Считается, что увеличение размера тромбоцитов связано с характером тромбоцитопоеза. В группе здоровых лиц корреляция между количеством тромбоцитов и FSC в покое и после активации отсутствовала, а данные, полученные у больных, указывают на возможное ускорение клиренса тромбоцитов, что может быть причиной усиления продукции и увеличения размера клеток.

В то же время, оценка гранулярности тромбоцитов по SSC позволяет интегрально оценить их внутриклеточную архитектуру. У здоровых детей корреляция между количеством и SSC клеток в покое и после активации отсутствовала, в отличие от пациентов, где расчеты указывают на нарушение внутриклеточной архитектуры клеток.

Автором установлено, что растворение (отщепление) субъединицы CD42b, определяемое с помощью расчетного индекса выявления этого маркера в покое / после активации, было ослаблено при тромбоцитопениях и тромбоцитемиях, что указывает на дисфункциональность тромбоцитов при данных заболеваниях.

Считается, что транспорт CD61 на мембрану из внутриклеточного депо при активации во многом зависит от сохранности механизмов реорганизации цитоскелета и связанных ферментативных реакций. Количество этого рецептора на мембране частично зависит от размера тромбоцитов, поэтому эффективность экспонирования CD61 после активации оценивали с помощью расчетного индекса CD61 после активации / в покое. Этот индекс был снижен при тромбоцитемиях и синдроме Вискотта-Олдрича (СВО), что отражает дисфункциональность тромбоцитов.

Автором изучена плотность главного рецептора агрегации CD41/61 в активированном состоянии по его способности связываться с антителом PAC1 в состоянии покоя и после активации тромбоцитов. Найдено, что выраженное нарушение активации интегрин, а значит и способности связываться с фибриногеном и агрегировать, наблюдалось в группах нормоклеточных НЗТ, СВО и отдельных пациентов в других группах.

Изучение особенностей флуоресценции загруженного мепакрина плотных гранул выявило уменьшение объёма плотных гранул и ослабление их высвобождения в группах тромбоцитемий / первичных тромбоцитозов, нормотромбоцитопений и СВО. Исследование позволило оценить вклад плотных гранул в формировании общей гранулярности тромбоцитов в группах пациентов и проиллюстрировало характер нарушений содержания гранул относительно размера тромбоцитов.

Повышение CD62p в покое считается одним из признаков внутрисосудистой преактивации тромбоцитов. Полученные данные позволили охарактеризовать нарушения α -гранул в группах пациентов с тромбоцитопениями, неуточнёнными геморрагическими состояниями (ГСН), получить новые сведения о гетерогенности количества / объёма α -гранул в группах пациентов и их возможной частичной внутрисосудистой дегрануляции.

Особенности образования фосфатидилсерин-положительных (прокоагулянтных) тромбоцитов с оценкой кратности увеличения их количества после активации показала высокую гетерогенность ответа в группах и ослабление прокоагулянтной активности у пациентов с тромбоцитопениями и ГСН при стимуляции.

Анализ корреляционных связей между размером тромбоцитов и долей прокоагулянтных клеток в покое и после активации выявил гетерогенность соотношения прокоагулянтных и проагрегантных субпопуляций, дополняя картину морфофункциональных нарушений в группах пациентов.

Выявлены характерные паттерны нарушений в группах пациентов с нормоклеточными наследственными заболеваниями тромбоцитов, нормоклеточными тромбоцитопениями, СВО, макротромбоцитопениями, первичными тромбоцитозами и ГСН.

Таким образом, научная новизна представленного исследования заключается в комплексном анализе особенностей фенотипа тромбоцитов с использованием теста ФАТ. Кроме того, автором описаны взаимосвязи между количеством, морфологией, фенотипом тромбоцитов и их вкладом в развитие клинической картины тромбоцитопатий и выявлены специфические нарушения у пациентов с неуточненным геморрагическим синдромом.

Значимость для науки полученных автором диссертации результатов

Полученные автором результаты позволили углубить фундаментальные знания о тромбоцитарном гемостазе и понимании морфофункциональных особенностей тромбоцитов у пациентов детского возраста с тромбоцитопатиями/пениями, повышенным количеством тромбоцитов и неуточненным геморрагическим синдромом. Определено, что исследование ФАТ может применяться для диагностики ряда классифицированных тромбоцитопатий, патологических изменений тромбоцитов у пациентов с неклассифицированными нарушениями функции тромбоцитов, ранее не описанных нарушений среди классифицированных наследственных заболеваний тромбоцитов. Обнаружено, что выявленные нарушения прокоагулянтной активности тромбоцитов связаны с тяжестью геморрагического синдрома.

Выводы диссертации соответствуют полученным результатам, а практические рекомендации конкретны и имеют прикладной характер. Их содержание свидетельствует о том, что автором решены поставленные задачи.

Результаты работы отражены в 20 публикациях, из них 10 – в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 9 – в зарубежных журналах, индексируемых реферативными базами данных Web of Science или Scopus. Автореферат отражает основные положения диссертации.

Принципиальных замечаний не имеется.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты исследования обобщают и дополняют современные представления о характере aberrантной активности тромбоцитов у детей с различными нарушениями их функции, выявленные методом проточной цитометрии. Результаты теста ФАТ позволяют рекомендовать использование этого метода для диагностики ряда НЗТ, а у больных с неуточненным геморрагическим синдромом почти в 40% случаев обнаружить специфические нарушения функций тромбоцитов, в том числе новые, ранее не описанные.

Результаты работы внедрены в клинику ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России и используются при в подготовке ординаторов и курсантов на кафедрах гематологии, клеточных технологий, трансфузиологии, клинической лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Диссертация Полохова Д.М. имеет практическую направленность, ее результаты и выводы целесообразно внедрять в работу учреждений, оказывающих

диагностическую и лечебную помощь больным, страдающим нарушениями функций тромбоцитов, а также использовать при последиplomной подготовке врачей-гематологов, трансфузиологов, специалистов клинической лабораторной диагностики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Полохова Дмитрия Михайловича «Диагностика нарушений функции тромбоцитов у детей с использованием метода проточной цитометрии», является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством д.м.н., доцента Жаркова Павла Александровича, в которой решена актуальная задача совершенствования подхода к использованию метода проточной цитометрии для диагностики нарушений функции и количества тромбоцитов у пациентов с нарушениями гемостаза.

Представленная работа на соискание учёной степени кандидата медицинских наук, по актуальности, научной и практической значимости, объёму проведенных исследований, количеству публикаций в рецензируемых изданиях и личному вкладу автора, соответствует критериям п.9, п. 10, п. 11, п. 13, п. 14, раздела II «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановления Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101), предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор Полохов Дмитрий Михайлович заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.28. Гематология и переливание крови.

Отзыв обсужден на заседании ученого совета ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России» (Протокол № 3 от 26 апреля 2023 г).

Заведующий лабораторией клеточной и молекулярной иммунологии
ФГБУН «Кировский НИИ гематологии
и переливания крови ФМБА России»,

к.м.н. Е.Л. Назарова
« 16 » мая 2023 г.

Адрес: 610027, г. Киров, ул. Красноармейская, д.72.

Телефон: (8332) 54-97-31

Электронный адрес: mail@niigpk.ru

Должность и подпись Е.Л. Назаровой заверяю
Директор, д.м.н. И.В. Парамонов



В диссертационный совет 21.1.025.01
 На базе федерального государственного бюджетного учреждения
 «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и
 иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской
 Федерации

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

по диссертации Полохова Дмитрия Михайловича на тему: «Диагностика нарушений функции тромбоцитов у детей с использованием метода проточной цитометрии» представленной к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови

<p>Полное и сокращённое название ведущей организации</p>	<p>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России)</p>
<p>Фамилия Имя Отчество, учёная степень, ученое звание руководителя ведущей организации</p>	<p>Парамонов Игорь Владимирович, директор, доктор медицинских наук</p>
<p>Фамилия Имя Отчество лица, утвердившего отзыв ведущей организации, ученая степень, отрасль науки, ученые специальности, по которым им защищена диссертация, ученое звание, должность и полное наименование организации, являющейся основным местом ее работы</p>	<p>Парамонов Игорь Владимирович, доктор медицинских наук, Специальность: 14.01.21. Гематология и переливание крови Директор, ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России» Согласен на обработку персональных данных.</p>
<p>Фамилия Имя Отчество лица, учёная степень, ученое звание сотрудника, составившего отзыв ведущей организации</p>	<p>Назарова Елена Львовна, кандидат медицинских наук, Специальность: 14.01.21. Гематология и переливание крови Заведующая лабораторией клеточной и молекулярной биологии, ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России» Согласен на обработку персональных данных.</p>
<p>Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет</p>	<p>1. А.Х. Габдулхакова, В.А. Овсепян, Е.В. Трегубова, Е.Л. Назарова. Взаимосвязь мутационного статуса генов jak2, calg и mpl с фенотипическими особенностями эссенциальной тромбоцитемии. Вестник гематологии. 2019. Т. 15. № 3. С. 13-14. 2. А.Х. Габдулхакова, В.А. Овсепян, Е.В. Трегубова, Е.Л. Назарова. Фенотипические особенности эссенциальной тромбоцитемии в зависимости от наличия мутаций генов jak2,</p>

	<p>calr и mpl. Вестник гематологии. 2019. Т. 15. № 4. С. 33-34.</p> <p>3. С.В. Игнатьев, М.Е. Ковтунова, Е.В. Ройтман, К.А. Воробьев, А.В. Лянгузов. История и перспективы научных исследований по проблемам гемостаза (к юбилею ФГБУН КНИИГИПК ФМБА России). Тромбоз, гемостаз и реология. 2021. № 1. С. 90-99.</p> <p>4. А.В. Лянгузов, С.В. Игнатьев, М.Е. Ковтунова, К.А. Воробьев. Патологические особенности взаимодействия фактора Виллебранда и тромбоцитов при тромбообразовании (обзор литературы). В сборнике: Актуальные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии. Материалы Всероссийской юбилейной конференции. К 60-летию Кировского научно-исследовательского института гематологии и переливания крови. Киров, 2020. С. 149-159.</p> <p>5. А.В. Лянгузов, С.В. Игнатьев, Ф.С. Шерстнев, С.В. Утемов, С.Л. Калинина, О.Ю. Сергунина А.Ю. Буланов, И.П. Счастливецва. Применение криоконсервированного концентрата тромбоцитов при глубокой тромбоцитопении. Трансфузиология. 2020. Т. 21. № 1. С. 20-30.</p> <p>6. А.В. Лянгузов, С.Л. Калинина, С.В. Игнатьев, И.А. Докшина, А.Ю. Буланов, Н.В. Минаева, И.В. Парамонов. Особенности вязко-эластических свойств сгустка крови и проявления геморрагического синдрома при тромбоцитопении у онкогематологических больных. Тромбоз, гемостаз и реология. 2020. № 4. С. 102-108.</p> <p>7. А.В. Лянгузов, С.В. Игнатьев, Ф.С. Шерстнев, С.В. Утемов, С.Л. Калинина, О.Ю. Сергунина. Использование криоконсервированного концентрата тромбоцитов при тяжелой тромбоцитопении у больных гемобластомами. Вестник гематологии. 2020. Т. 16. № 4. С. 49-50.</p>
Адрес организации	610027, Кировская область, Киров, Красноармейская, 72
Телефон	+7 (8332) 54-17-70

Адрес электронной почты	niigpk@fmbamail.ru
Адрес официального сайта в сети «Интернет»	https://www.niigpk.ru/

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

Директор
ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт
гематологии и переливания крови Федерального
медико-биологического агентства»
доктор медицинских наук

31 марта 2023г.



Парамонов Игорь Владимирович