Отзыв официального оппонента

на диссертацию Пономаренко Евгении Александровны на тему «Исследование функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ методом проточной цитометрии», представленную к защите в диссертационный совет 99.1.098.02 на базе ФГБУН ЦТП ФХФ РАН и ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.8. «Клиническая лабораторная диагностика»

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа Пономаренко Е.А. посвящена отработке условий и апробации протокола тестирования функциональной активности тромбоцитов с помощью проточной цитометрии при их активации аденозиндифосфатом (АДФ). Известно, что АДФ относится к ключевым физиологическим агонистам тромбоцитов, а один из его тромбоцитарных рецепторов (P2Y12) служит мишенью для таких широко применяемых антитромбоцитарных препаратов, как клопидогрел, прасугрел и тикагрелор. Проточная цитометрия в последние годы стала одним из основных методов оценки активности тромбоцитов. Этот метод, в отличие от стандартного измерения агрегации тромбоцитов с помощью турбидиметрического метода, позволяет проводить исследования в небольших объемах цельной крови (агрегация тромбоцитов изучается в обогащенной тромбоцитами плазме) и при низких концентрациях тромбоцитов. Проточная цитометрия может применяться для оценки состояния тромбоцитов у гематологических больных с нарушениями гемостаза и у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями и риском тромбозов, получающими антитромбоцитарные препараты. В связи с этим разработка протоколов для проведения исследований тромбоцитов с помощью проточной цитометрии является актуальной и клинически значимой задачей лабораторной диагностики.

Научная и практическая значимость полученных результатов

Автором был разработан метод исследования тромбоцитов с помощью проточной цитометрии при их активации АДФ. Был использован широкий спектр маркеров активации тромбоцитов: (1) антитела PAC-1 против активированной формы рецептора фибриногена тромбоцитов, комплекса гликопротеинов (ГП) IIb-IIIa (CD41/CD61), (2) антитела против белка мембран альфа-гранул Р-селектина (CD62P), появляющегося на поверхности активированных тромбоцитов после экзоцитоза гранул, (3) антитела против рецептора фактора Виллебранда, ГП Ib (CD42b), количество которого снижается при активации тромбоцитов, (4) мепакрин, флуоресцентный краситель, накапливающийся и

секретируемый из плотных гранул, (5) аннексин V, взаимодействующий с фосфатидилсерином (ФС), фосфолипидом, определяющим прокоагулянтные свойства тромбоцитов. Были подобраны условия активации тромбоцитов - оптимальная концентрация АДФ (5 мкМ), оптимальные разведения крови и времена инкубации с маркерами тромбоцитов; оценена возможность транспортировки и фиксации анализируемых проб. Метод был апробирован при изучении действия антагонистов P2Y12 рецептора АДФ in vitro (препарат тикагрелор) и при их приеме пациентами с сердечно-сосудистыми патологиями (препараты тикагрелор и прасугрел в сочетании с аспирином). В обоих случаях наблюдалось значимое снижение показателей активации тромбоцитов, стимулированных АДФ. Также с помощью этого подхода удалось зарегистрировать изменения функциональной активности тромбоцитов у больных с иммунной тромбоцитопенией (ИТП). В следующей части работы автором было проведено подробное сравнительное исследование показателей активности тромбоцитов у взрослых и у детей разных возрастных групп. В этом случае тромбоциты были активированы не только АДФ, но двумя наборами сильных индукторов: (1) пептидом. активирующим PAR-1 рецептор тромбина в сочетании с коллагеноподобным пептидом (CRP), (2) пептидами, активирующими PAR-1 и PAR-4 рецепторы тромбина в сочетании с АДФ. В большинстве тестов оба набора сильных индукторов вызывали насыщающие проявления активации тромбоцитов. Автором было установлено, что у детей младшего возраста (1-5 лет) тромбоциты отличаются меньшими размерами и имеют по ряду тестов более низкую активность тромбоцитов. Это наблюдение очевидно имеет важное практическое значение с точки зрения проведения исследований активности тромбоцитов у педиатрических пациентов и корректного формирования контрольных групп. Также в заключительной части работы автором была сделана попытка определить причины зарегистрированных изменений активности тромбоцитов у больных с ИТП путем исследования влияния на активность контрольных тромбоцитов плазмы этих пациентов и плазмы здоровых доноров. Очевидно, что представленного материала достаточно для диссертационной работы на соискание степени кандидата биологических наук и они по своей тематике соответствуют специальности 3.3.8. «Клиническая лабораторная диагностика»

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов

Обоснованность и достоверность полученных результатов определяется адекватностью методов, предложенных для оценки активности тромбоцитов (проточная цитометрия с использованием АДФ и других индукторов для активации тромбоцитов), подбором достаточного количества пациентов и корректной статистической обработкой результатов

Научная новизна полученных результатов

В работе впервые были впервые проведены сравнительные исследования активности тромбоцитов, измеренной с помощью проточной цитометрии у взрослых и детей различного возраста и обнаружено снижение размера и показателей активации тромбоцитов у детей младшей возрастной группы (1-5 лет).

Общая характеристика, структура и объем диссертации

Диссертация Пономаренко Е.А. изложена на 121 станице и построена по традиционной схеме, включая главы: «Введение, «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Практические рекомендации» и «Библиографический список». Обзор литературы свидетельствует о хорошем знании автором в области изучения тромбоцитов, включая вопросы, непосредственно связанные с тематикой работы: методы исследования функции тромбоцитов и функциональная активность тромбоцитов в детском возрасте. Список цитируемой литературы содержит 199 отечественных и зарубежных источников. Материалы и методы изложены достаточно подробно, так что все методики могут быть воспроизведены по представленному описанию. Результаты представлены логично и хорошо иллюстрированы – раздел Результаты содержит 28 рисунков. Обсуждение результатов завершает подведение итогов работы и представления ее возможного развития на перспективу. Выводы в целом соответствуют полученным результатам. Диссертация написана хорошим языком и содержит минимальное количество стилистических неточностей и опечаток. Единственное замечание к представлению материала связано с недостаточной характеристикой пациентов с ИТП - в тексте нигде не указаны показатели концентрации тромбоцитов (глубина тромбоцитопении).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано восемь статей, в том числе в ведущих международных изданиях по тромбозу и гемостазу (три статьи в журнале “Platelets”, и одна статья в журнале “Hematologica”). Результаты диссертации неоднократно докладывались на международных и отечественных научных конференциях (одиннадцать тезисов).

Замечания и вопросы

1. В протоколах исследования тромбоцитов с помощью проточной цитометрии автор добавляет кальций содержащий буфер к крови, антикоагулированной цитратом натрия.

Несмотря на значимые разведения образцов крови, это может вызывать активацию коагуляционного каскада и образования эндогенного тромбина. Не может ли это приводить к дополнительной активации (или наоборот к десенситизации тромбоцитов), и изменениям их реактивности, особенно фоновой (без экзогенных индукторов) и при использовании слабых индукторов (в частности АДФ)?

2. Не совсем понятно зачем авторы используют два набора сильных индукторов в высоких концентрациях при сравнительном исследовании активности тромбоцитов у детей и взрослых: (1) пептид, активирующий PAR-1 рецептор тромбина в сочетании с CRP, и (2) пептиды, активирующие PAR-1 и PAR-4 рецепторы в сочетании с АДФ? За исключением экспонирования ФС в остальных тестах (активация ГП IIb-IIIa, экзоцитоз гранул и т.д.) наблюдаются насыщающие, не отличающиеся друг от друга ответы.

3. На рисунках 19 и 22 автор проводит нормирование некоторых показателей активации тромбоцитов на их размер. Однако в качестве параметра, характеризующего размер тромбоцитов, почему-то используется не прямое светорассеивание, а содержание на поверхности тромбоцитов CD61 (ГП IIIa) антигена.

4. Представленное в выводе 5 предположение о том, что антитромбоцитарные антитела из плазмы крови больных с ИТП могут усиливать активность тромбоцитов, выглядит недостаточно обоснованным. Во-первых, в работе не проводилось измерение антител, которые не всегда присутствуют в значимых количествах в плазме больных с ИТП (антитромбоцитарные антитела чаще находятся в связанном с тромбоцитами состоянии). Во-вторых, такие антитела обычно подавляют, и крайне редко активируют активность рецепторов-антигенов.

Следует отметить, что вопросы и замечания носят дискуссионный и рекомендательный характер и не снижают научную ценность и достоверность полученных результатов.

Заключение

Диссертация Пономаренко Евгении Александровны на тему «Исследование функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ методом проточной цитометрии», является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, содержащей решение научно-клинической задачи, связанной с разработкой протокола для оценки активности тромбоцитов с помощью проточной цитометрии, его апробацией на пациентах и выявлением особенностей активации тромбоцитов у детей по сравнению со взрослыми. По своей актуальности, новизне, практической и теоретической значимости методическому уровню и объему выполненных исследований работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения 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, Пономаренко Евгения Александровна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.8. «Клиническая лабораторная диагностика»

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник, и.о. руководителя лаборатории клеточной адгезии Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

доктор медицинских наук по специальностям

03.01.04 - биохимия и 14.01.05 - кардиология,

профессор Мазуров Алексей Владимирович

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

«20» ноября 2023 г.

В диссертационный совет 99.1.098.02

на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, Министерство науки и высшего образования Российской Федерации (109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30);

Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (117998, г. Москва, ул. Саморы Машела, д. 1)

СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по диссертации Пономаренко Евгении Александровны, соискателя ученой степени кандидата биологических наук, на тему: «Исследование функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ методом проточной цитометрии» по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

Фамилия, Имя, Отчество (полностью)	Ученая степень, наименование отрасли науки, научных специальностей, по которым им защищена диссертация. Ученое звание (при наличии).	Полное название и адрес организации, являющейся основным местом работы официального оппонента (на момент предоставления отзыва)	Занимаемая должность в организации (на момент предоставления отзыва)	Список основных публикаций в рецензируемых научных изданиях (не менее 5-ти работ за последние 5 лет по теме оппонируемой диссертации)
Мазуров Алексей Владимирович	доктор медицинских наук (03.00.04 биохимия, 14.00.06 кардиология), профессор	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации 121552 г. Москва, ул. Академика Чазова, д. 15а avmazurov@list.ru www.cardioweb.ru 8(495) 150-44-19	Главный научный сотрудник, и.о. руководителя лаборатории клеточной адгезии	1. Muravlev I.A., Dobrovolsky A.B., Antonova O.A., Khaspekova S.G., Mazurov A.V. Effects of platelets activated by different agonists on fibrin formation and thrombin generation // Platelets. – 2023. – Т.34. – №1. – С.2139365. 2. Tsvetaeva N.V., Nikulina O.F., Khaspekova S., Mazurov A. A rare case of immune thrombocytopenia with autoantibodies inhibiting platelet aggregation. Effects of romiplostim // Research and practice in thrombosis and haemostasis. – 2022. – Т.6. – №S1. – С.517. 3. Bodrova V.V., Shustova O.N., Khaspekova S.G., Mazurov A.V. Platelet reticulated forms, size indexes, and functional activity. Interactions in healthy volunteers // Platelets. – 2022. – Т.33. – №3. – С.398-403.

				4. Muravlev I.A., Antonova O.A., Golubeva N.V., Mazurov A.V. Platelets activated by different agonists produce microparticles with the same procoagulant properties // Thrombosis research. – 2021. – Т.207. – С.123-125. 5. Khaspekova S.G., Shustova O.N., Golubeva N.V., Naimushin Y.A., Larina L.E., Mazurov A.V. Circulating antiplatelet antibodies in pregnant women with immune thrombocytopenic purpura as predictors of thrombocytopenia in the newborns. Platelets. - 2019. – Т.30 - №8 - С.1008-1012..

Выше представленные данные подтверждаю и

согласен на обработку моих персональных данных: _____ А.В. Мазуров

(Ф.И.О. подпись официального оппонента)

Подпись официального оппонента заверяется в установленном учреждением порядке _____ О.С. Плеханова

(подпись, Ф.И.О. заверившего лица)

печать учреждения