УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ФГБУ ФНКЦ ФХМ

им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

д.б.н., профессор, член-корр. РАН

Лагарькова Мария Андреевна

_____

«24» ноября 2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России) – о научно-практической значимости диссертационной работы Пономаренко Евгении Александровны «Исследование функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ методом проточной цитометрии» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.8. – Клиническая лабораторная диагностика

Актуальность темы выполненной работы

Главной функцией тромбоцитов в организме человека является остановка кровотечения. Ее нарушения приводят к развитию кровотечений и тромбозов, которые могут далее стать причиной летального исхода. Таким образом, поиск стандартизованного, надежного и информативного метода оценки функции тромбоцитов является актуальной проблемой. «Золотым стандартом» в этой области считается метод оптической агрегометрии с использованием различных агонистов, одним из которых является аденозин дифосфат (АДФ). При этом метод требует забора большого объема крови и не применим при низких концентрациях тромбоцитов. Этих недостатков лишен метод проточной цитометрии, однако интерпретация результатов и сравнение данных между различными лабораториями затруднены в виду его низкой степени стандартизации. Существующие на сегодняшний день протоколы исследования тромбоцитарной функции при стимуляции АДФ с помощью проточной цитометрии различаются между собой по ряду параметров.

Важнейшей областью применения оптической АДФ-индуцированной агрегометрии является диагностика врожденных дефицитов и дефектов

рецептора P2Y12, которые проявляются в детском возрасте. Для новорожденных однозначно показано снижение активности тромбоцитов относительно взрослых, тогда как для детей старшего возраста есть сведения как о более высокой, так и о более низкой функции тромбоцитов в сравнении с взрослыми. Также не определен возраст, когда исчезают различия в активности тромбоцитов между детьми и взрослыми.

В отличии от оптической агрегометрии, метод проточной цитометрии может использоваться при низких концентрациях тромбоцитов, что актуально для таких заболеваний, как иммунная тромбоцитопения (ИТП). Известно, что при этом заболевании тромбоциты экспрессируют в состоянии покоя некоторые активационные маркеры на более высоком уровне, чем в норме, то есть предактивированы. Сообщают как о сниженном ответе на стимуляцию АДФ тромбоцитов пациентов с ИТП по сравнению с тромбоцитами здоровых добровольцев, так и об отсутствии различий в активационном ответе.

Диссертационная работа Пономаренко Е.А. посвящена разработке метода исследования тромбоцитарной функции при стимуляции АДФ с помощью проточной цитометрии, сравнению активности тромбоцитов детей разных возрастных групп и взрослых добровольцев, а также исследованию влияния различных видов предактивации тромбоцитов на их ответ на стимуляцию АДФ. Совершенствование лабораторного контроля функции тромбоцитов особенно актуально для пациентов, получающих двойную антиагрегантную терапию, поскольку у них повышен риск таких потенциально летальных осложнений, как тромбозы и кровотечения. Исследование тромбоцитарного гемостаза в детском возрасте имеет важное значение в педиатрии и позволяет более правильно интерпретировать результаты теста функции тромбоцитов и диагностировать врожденные тромбоцитопатии. Исследование влияния предактивации тромбоцитов на их ответ на стимуляцию АДФ улучшает понимание функции тромбоцитов пациентов с ИТП. В связи с этим работу следует признать актуальной.

Общая характеристика и структура диссертационной работы

Диссертационная работа Пономаренко Е.А. имеет традиционную структуру. Она изложена на 121 странице и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, их обсуждения и выводов. Работа содержит 33 рисунка и 3 таблицы, а также список литературы из 199 литературных источников.

Во введении описывается актуальность исследования, степень разработанности темы, ее научная новизна, теоретическая и практическая значимость, а также приведены цель и задачи исследования.

В главе 1 – Обзор литературы – приведены сведения о жизненном цикле тромбоцитов и их разнообразных функциях, описаны различные нарушения

гемостатической функции тромбоцитов и существующие на сегодняшний день методы ее оценки, а также кратко изложены сведения об активности тромбоцитов в детском возрасте. Обзор литературы достаточно содержателен и включает последние данные по исследуемой теме.

Глава 2 – Материалы и методы. В ней описаны протоколы исследования кинетики связывания антител и активации тромбоцитов АДФ, исследования влияния аналитических и преаналитических параметров, тестов функциональной активности тромбоцитов при различных видах стимуляции, предактивации тромбоцитов низкой дозой АДФ и плазмой пациентов с ИТП. Также автор описывает использование метода проточной цитометрии и статистические методы обработки данных.

Главы 3 и 4 посвящены описанию полученных результатов и их обсуждению. В разделе 3.1 описывается разработка протокола исследования на стимуляцию АДФ методом проточной цитометрии, исследуется влияние различных аналитических и преаналитических параметров. Также приводятся результаты апробации протокола на здоровых детях и взрослых добровольцах, на пациентах на двойной антиагрегантной терапии и пациентах с ИТП. Помимо этого, проведено исследование in vitro влияния ингибитора рецептора P2Y12 тикагрелора. Раздел 3.2 посвящен исследованию возрастных изменений активационного ответа тромбоцитов здоровых детей разных возрастных групп при различных видах стимуляции, имитирующих разные стадии образования тромба. Проведено сравнение активности тромбоцитов как между детьми и взрослыми, так и между разными возрастными группами детей. Также показано, что различия в функции тромбоцитов детей и взрослых сохраняются до 18 лет. Раздел 3.3 посвящен исследованию влияния предактивации тромбоцитов низкой дозой АДФ и плазмой пациентов с ИТП, показано их разнонаправленное действие на ответ тромбоцитов на стимуляцию АДФ.

Последняя глава работы 4 содержит обсуждение полученных результатов и перспективы дальнейшего развития темы исследования.

По результатам диссертационной работы опубликованы 6 статей в рецензируемых журналах, представлены тезисы докладов на 11 российских и международных конференциях.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

Научная новизна работы определяется разработкой метода исследования функции тромбоцитов при стимуляции АДФ с помощью проточной цитомерии, обладающего высокой чувствительностью к стимуляции агонистом при низком проценте образования тромбоцитарных агрегатов. Показана чувствительность метода к изменениям в функции тромбоцитов у пациентов, получающих антиагрегантную терапию, и

пациентов с ИТП. Также проведено сравнение активности тромбоцитов не только между детьми и взрослыми, но и между разными возрастными группами детей. Четко определен возраст, когда исчезают различия в тромбоцитарной функции между детьми и взрослыми. Кроме того, показано, что предактивация тромбоцитов плазмой пациентов с ИТП вызывает усиление их активационного ответа на стимуляцию АДФ, тогда как предактивация низкой дозой АДФ вызывает его снижение.

Метод, разработанный Пономаренко Е.А., позволяет проводить мониторинг ингибирования функции тромбоцитов у пациентов на двойной антиагрегантной терапии, чтобы избежать образования тромбов и развития кровотечений. Исследование функции тромбоцитов детей позволяет более правильно диагностировать врожденные дефициты и дефекты рецептора P2Y12, манифестирующего в детском возрасте. Исследование влияния предактивации тромбоцитов плазмой пациентов с ИТП улучшают понимание активности тромбоцитов у пациентов с этим заболеванием.

Достоверность и обоснованность результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена достаточным объемом полученных данных и применением современных методов статистического анализа. Сделанные выводы обоснованы и подтверждены экспериментальными данными, достоверность которых подтверждена статистическим анализом.

Что касается замечаний, то в работе присутствуют отдельные грамматические ошибки и опечатки, в частности, при оформлении списка цитируемой литературы. Ряд рисунков представлен в слишком малом масштабе (см., например, рис. 16-22, 25-29), в результате подписи на осях едва читаемы, что затрудняет их восприятие. Вызывает некоторое удивление тот факт, что автор, несмотря на выявление целого ряда преимуществ разработанного метода оценки функциональной активности тромбоцитов с помощью проточной цитометрии по сравнению с известными аналогами, не предприняли попытку защиты интеллектуальной собственности в виде патентования. Указанные замечания не являются принципиальными и не затрагивают суть, основные выводы и результаты работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Пономаренко Евгении Александровны «Исследование функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ методом проточной цитометрии» является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научных задач по разработке метода исследования функции тромбоцитов при стимуляции АДФ

с помощью проточной цитометрии, сравнению функции тромбоцитов детей разных возрастных групп и взрослых и исследованию влияния различных видов предактивации тромбоцитов на их ответ на стимуляцию АДФ. Все эти задачи имеют существенное значение для клинической лабораторной диагностики. По новизне, актуальности решаемых задач, объему и методическому уровню проведенных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Пономаренко Е.А. соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 №842 (в ред. постановления Правительства Российской Федерации от 26.09.2022 №1690), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.8. – Клиническая лабораторная диагностика.

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на общем заседании отделов биофизики и клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России (протокол № 11-23 от «18» октября 2023 г.).

Составитель отзыва Гусев Сергей Андреевич, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории физико-химических методов исследования и анализа Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства.

Рабочий тел. +7 (499) 246-44-547

e-mail: ser_gus@mail.ru

_____ (С.А. Гусев)

Подпись Гусева С.А. заверяю

Ученый секретарь ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,

кандидат биологических наук

_____ (О.П. Лихнова)

24.10.2023г.

Сведения о ведущей организации

о ведущей организации по диссертационной работе Пономаренко Евгении Александровны на тему «Исследование функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ методом проточной цитометрии», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Полное наименование организации:	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»
Сокращенное наименование организации:	ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России
Место нахождения:	г. Москва, 119435, ул. М. Пироговская 1а
Почтовый адрес с индексом:	г. Москва, 119435, ул. М. Пироговская 1а
Телефон:	8(499)246-77-21
e-mail:	info@rcpcm.org, director@rcpcm.org
Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность руководителя ведущей организации:	Лагарькова Мария Андреевна, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, генеральный директор
Адрес официального сайта в сети «Интернет» (при наличии):	www.rcpcm.org
Лаборатории, Кафедры или другие научные подразделения, деятельность которых связана с научным направлением диссертации:	Отдел биофизики, Лаборатория физико-химических методов исследования и анализа, Лаборатория медицинских нанотехнологий, Лаборатория прикладных биомедицинских микросистем, Лаборатория электрофизиологии

Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых изданиях за последние 5 лет:

1. Gorudko I.V., Grigorieva D.V., Shamova E.V., Gorbunov N.P., Kokhan A.U., Kostevich V.A., Vasilyev V.B., Panasenko O.M., Khinevich N.V., Bandarenka H.V., Burko A.A., Sokolov A.V. Structure-biological activity relationships of myeloperoxidase to effect on platelet activation //Archives of Biochemistry and Biophysics. 2022. V. 728:109353.
2. D.I. Roshchupkin, V.L. Sorokin, G.N. Semenkova, K.V. Buravleva, M.A. Murina. The Properties of Biologically Significant Chloramine Oxidants: Reactivity and Its Dependence on the Structure of the Functional Atom Group. //Biophysics, 2019, 64(2):145-154.
3. M. A. Murina, D. I. Roshchupkin, V. I. Sergienko. The Antiplatelet Effect and Chemical

Activity of N6-Chloroadenosine Phosphate. //Biophysics, 2021, 66:535–540.
4. L. D. Shuvalova, A. V. Eremeev, A. N. Bogomazova, E. V. Novosadova, E. A. Zerkalenkova, Yu. V. Olshanskaya, E. Y. Fedotova, E. S. Glagoleva, S. N. Illarioshkin, O. S.Lebedeva, M. A. Lagarkova. Generation of induced pluripotent stem cell line RCPCMi004-A derived from patient with Parkinson's disease with deletion of the exon 2 in PARK2 gene //Stem cell research. – 2020. – T. 44. – C. 101733.
5. Aleksandra S. Taran, Lilia D. Shuvalova, Maria A. Lagarkova, Irina B. Alieva. Huntington's Disease—An Outlook on the Interplay of the HTT Protein, Microtubules and Actin Cytoskeletal Components //Cells. – 2020. – T. 9. – №. 6. – C. 1514.
6. Artem V. Luzhin Bogdan Avanesyan, Artem K. Velichko, Victoria O. Shender, Natalia Ovsyannikova, Georgij P. Arapidi, Polina V. Shnaider, Nadezhda V. Petrova, Igor I. Kireev, Sergey V. Razin, Omar L. Kantidze. Chromatin Trapping of Factors Involved in DNA Replication and Repair Underlies Heat-Induced Radio-and Chemosensitization //Cells. – 2020. – T. 9. – №. 6. – C. 1423.
7. Julia A. Filippova, Anastasiya M. Matveeva, Evgenii S. Zhuravlev, Evgenia A. Balakhonova, Daria V. Prokhorova, Sergey J. Malanin, Raihan Shah Mahmud, Tatiana V. Grigoryeva, Ksenia S. Anufrieva, Dmitry V. Semenov, Valentin V. Vlassov, Grigory A. Stepanov. Are small nucleolar RNAs "CRISPRable"? A report on box C/D small nucleolar RNA editing in human cells //Frontiers in pharmacology. – 2019. – T. 10. – C. 1246.
8. Lyapina I., Filippova A., Kovalchuk S., Ziganshin R., Mamaeva A., Lazarev V., Latsis I., Mikhalchik E., Panasenko O., Ivanov O., Ivanov V., Fesenko I. Possible role of small secreted peptides (SSPs) in immune signaling in bryophytes. Plant. Mol. Biol. 2021. V. 106(1-2). P. 123-143. doi: 10.1007/s11103-021-01133-z.
9. A. M. Belova, D. V. Basmanov, K. A. Prusakov, V. N. Lazarev, and D. V. Klinov. A Microfluidic Platform for the Development of a Biosensor Based on Genetically Modified Helicobacter pylori Single Cells // CELL BIOPHYSICS (2018), Vol. 63, No. 5, pp. 923–932
10. K. A. Prusakov, D. V. Bagrov, D. V. Basmanov, S. A. Romanov, and D. V. Klinov, "Fluorescence imaging of cells using long-range electromagnetic surface waves for excitation // Appl. Opt. 59, 4833-4838 (2020)
11. Bashkirov, P. V., Kuzmin, P. I., Chekashkina, K., Arrasate, P., Lillo, J. V., Shnyrova, A. V., & Frolov, V. A. Reconstitution and real-time quantification of membrane remodeling by single proteins and protein complexes. Nature Protocols. 2020, Vol. 15(8), 2443-2469.
12. Espadas J., Pendin D., Bocanegra R., Escalada A., Misticoni G., Trevisan T., Velasco-Olmo A., Montagna A., Bova S., Ibarra B., Kuzmin P.I., Bashkirov P.V., Shnyrova A.V., Frolov V.A., and Daga A. Dynamic constriction and fission of endoplasmic reticulum membranes by reticulon. Nature Communication, 2019, Nov 22;10(1):5327
13. Bassereau P, Jin R, Baumgart T, Deserno M, Dimova R, Frolov VA, Bashkirov PV, Grubmüller H, Jahn R, Risselada HJ, Johannes L, Kozlov MM, Lipowsky R, Pucadyil TJ, Zeno WF, Stachowiak JC, Stamou D, Breuer A, Lauritsen L, Simon C, Sykes C, Voth GA, Weikl TR. The 2018 Biomembrane Curvature and Remodeling Roadmap. Journal of Physics D: Applied Physics, 2018, Vol. 51(34), 343001.

Даем согласие на размещение персональных данных на официальном сайте Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный

медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации ив единой информационной системе, включение персональных данных в аттестационное дело и их дальнейшую обработку.

Ведущая организация подтверждает, что соискатель и его научный руководитель (консультант) не являются ее сотрудниками, а также в ведущей организации не ведутся научно-исследовательские работы, по которым соискатель ученой степени является руководителем или работником организации-заказчика или исполнителем (соисполнителем).

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ
ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,
к.б.н. Лихнова О.П.