

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 темы исследования.

Разработка и использование эффективных способов стимулирования процессов физиологической и репаративной регенерации тканей организма является актуальной задачей регенеративной медицины. С целью решения этой задачи ведется активный поиск препаратов, создаваемых на основе современных клеточных технологий. Перспективным в этом отношении представляется использование биотрансплантатов и биоконструкций, изготовленных на основе тромбоцитов. Тромбоциты содержат широкий спектр цитокинов, факторов роста и дифференцировки клеток, факторов ангиогенеза, что в совокупности определяет потенциальную возможность их участия в регулировании процессов регенерации и репарации поврежденных тканевых структур.

Существует значительное число работ, посвященных изучению морфологии и функции тромбоцитов, а также способам изготовления тромбоцитных препаратов, обладающих регенеративным действием, и оценке клинического эффекта их применения. Однако в большинстве подобного рода исследований не принимается во внимание, что регенеративный потенциал тромбоцитов может реализовываться по-разному в зависимости от их исходного морфофункционального состояния и условий использования в медицинских целях. В связи с этим при производстве тромбоцит-насыщенных биоконструкций востребованными являются: предварительный анализ биологической полноценности тромбоцитов крови доноров; определение морфофункциональных характеристик тромбоцитов, отражающих их биологическую активность и возможность реализации их потенциала; использование методов регуляции активности тромбоцитов в составе тромбоцит-содержащих препаратов, оценка эффективности применения таких препаратов в клинической практике.

В диссертации Макарова М.С. в значительной мере решаются эти задачи. Автором также разработаны и предложены новые стандарты создания эффективных тромбоцит-насыщенных биопрепаратов, что в целом определяют высокую актуальность проведенного им исследования.

Новизна полученных результатов, научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

В диссертации Макарова М.С. рассматриваются и предлагаются принципиально новые подходы к исследованию и реализации регенеративного потенциала тромбоцитов. Автором приведены и обобщены оригинальные сведения о морфофункциональном статусе тромбоцитов крови доноров, о возможных способах активации и стабилизации тромбоцитов в составе приготовленных на их основе биопрепаратов, о методических подходах к созданию тромбоцитных препаратов с высоким содержанием тромбоцитарных ростовых факторов, об эффективности использования тромбоцит-содержащих биоконструкций для стимуляции процессов пролиферации и репаративной регенерации.

С помощью метода витального окрашивания с последующей флуоресцентной микроскопией, позволяющего оценивать состояние жизнеспособных клеток, убедительно доказана морфологическая и функциональная варибельность тромбоцитов человека во всех изученных гендерно-возрастных группах. Впервые проведена подробная сравнительная оценка морфофункциональных свойств тромбоцитов, выделенных из консервированной крови доноров (способность к адгезии, интенсивность образования ламеллоподий, количество цитоплазматических гранул и проч.), и установлена зависимость характера и скорости их функционального ответа на активацию от исходного морфофункционального статуса.

Проведен скрининг различных способов стимуляции биологической активности тромбоцитов (высокие концентрации диметилсульфоксида, изотоничность и редокс-потенциал среды, низкоимпульсное лазерное облучение) без использования стандартных индукторов агрегации. В результате, впервые установлены оптимальные условия, способствующие дегрануляции тромбоцитов *in vitro* и намечены перспективы использования неканонических способов активации тромбоцитов для создания препаратов, насыщенных тромбоцитарными факторами роста.

Показана возможность стабилизации тромбоцитарных гранул в пуле адгезирующих и агрегирующих тромбоцитов без нарушения их структурной целостности и цитокинового состава гранул. Впервые проведена сравнительная оценка способов стабилизации гранул тромбоцитов с помощью антиагреганта тикагрелора, наночастиц серебра, аскорбиновой кислоты, перекиси водорода, на основании которой отобраны методы, оптимально пригодные для изготовления тромбоцитных препаратов с высоким содержанием факторов роста.

Приоритетной является характеристика цитокинового состава секреторных гранул тромбоцитов в полученных разными способами препаратах. Установлена корреляция между уровнем ростовых факторов в бесплазменном тромбоцитном лизате и морфофункциональными параметрами исходных тромбоцитов. Разработаны новые способы получения из неконсервированной крови тромбофибринового сгустка, обладающего ростостимулирующими свойствами.

Впервые в опытах *in vitro* показан ростостимулирующий эффект тромбоцитов, стабилизированных наночастицами серебра, а также изучено влияние коллагеновых матриксов, насыщенных стабилизированными и нестабилизированными тромбоцитами, на репаративную регенерацию кожи у экспериментальных животных.

Достоверность полученных результатов и степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Достоверность результатов диссертационного исследования Макарова М.С., обоснованность сформулированных им научных положений, выводов и рекомендаций не вызывают сомнений и подтверждаются:

- достаточной по объему выборкой объектов исследования – консервированная и неконсервированная кровь доноров и аферезные тромбоцитные концентраты, из которых путем оптимизации существующих методик готовились предназначенные для изучения препараты тромбоцитов;
- использованием методов исследования, адекватных сформулированным задачам – витальное окрашивание, световая и флуоресцентная микроскопия, гистологический анализ, морфометрия и цитометрия, иммуноцитохимия;
- использованием эффективных методов активации или стабилизации секреторной активности тромбоцитов и их сравнительной оценкой;
- выбором широкого набора параметров, позволяющих объективно оценить количество, морфофункциональный статус и реактивные свойства тромбоцитов в ходе реализации запланированного исследования;
- продуманным дизайном и выбором соответствующих объектов экспериментальных исследований – культуры фибробластов и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, мышцы линии Balb/c, ожоговые и резаные раны кожи;
- квалифицировано выполненным статистическим анализом результатов исследования.

Автором достаточно полно проанализирована современная литература по теме диссертации. Сопоставление полученных в работе фактов с данными литературы и их

критический анализ определяют объективность сформулированных выводов, которые логически вытекают из результатов проведенного исследования.

Материалы диссертационного исследования полностью отражены в 69 публикациях автора, включая журналы из перечня ВАК и международных баз научного цитирования.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов.

Ряд фактов, полученных Макаровым М.С. в ходе проведенных исследований, имеет научно-теоретическую значимость. Результаты работы и их обсуждение конкретизируют существующие представления о морфологической вариабельности тромбоцитов человека, о скорости и механизмах экстррузии секреторных гранул в разных субпопуляциях тромбоцитов, о влиянии тромбоцитных компонентов на пролиферацию клеток и на процессы репаративной регенерации, а также свидетельствуют о полифункциональности тромбоцитов, присутствующих в консервированной крови доноров и в приготовленных из нее тромбоцитных препаратах.

Важными с практической точки зрения достижениями автора являются: отработка методик, используемых для оценки суммарного биологического потенциала тромбоцитарного пула; анализ морфофункциональных свойств тромбоцитов человека при разных способах неканонической активации, позволяющих использовать их биоактивность в разных формах; установление возможности стабилизации секреторных гранул в адгезирующих тромбоцитах без нарушения их структурности целостности и цитокинового спектра; разработка подходов к насыщению коллагеновых матриксов тромбоцитарными ростовыми факторами; оценка пролиферативной активности в культуре клеток и репарации кожных ран при использовании аппликативных биопрепаратов на основе тромбоцитов человека; обоснование необходимости оценки цитокинового профиля тромбоцитов, предназначенных для приготовления тромбоцитных препаратов, еще на этапе обследования доноров.

Макаровым М.С. также изучено влияние разных режимов центрифугирования на качество суспензии тромбоцитов и оптимизированы методики получения тромбоцитных препаратов; разработаны способ получения тромбофибринового сгустка, обладающего рост-стимулирующим эффектом, и способ получения бесплазменного тромбоцитарного лизата с высоким содержанием ростовых факторов; установлена дозозависимость биологического эффекта тромбоцитных препаратов при разных способах подготовки

тромбоцитов и их компонентов; исследована структурная целостность коллагена в составе коллагеновых матриц и тканевых трансплантатов, используемых в качестве раневых покрытий, при создании биологических конструкций.

Все эти результаты имеют практическую значимость и могут быть востребованы в научно-исследовательской и практической деятельности при решении широкого спектра задач в области клеточной биологии, биотехнологии и биоинженерии, регенеративной медицины, производственной и клинической трансфузиологии, клинической и экспериментальной гематологии, физиологии, патологической анатомии.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Результаты исследования Макарова М.С. уже внедрены в практику деятельности двух лечебных учреждений города Москвы (отделение гнойной хирургии ГКБ № 13 и отделение неотложной травматологии опорно-двигательного аппарата НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского). С целью расширить круг заинтересованных специалистов можно предложить автору подготовить и издать методические рекомендации с конкретизацией использованных им подходов к морфофункциональному анализу тромбоцитов в крови доноров, оптимизированных методик получения тромбоцитных препаратов, предпочтительных способов стабилизации тромбоцитарных гранул, неканонических путей активации тромбоцитов и ряда других вопросов. Можно полагать, что такого рода методические указания представят большой интерес и окажутся полезными для научно-практической работы специалистов, занимающихся изучением биологического потенциала тромбоцитов, приготовлением насыщенных тромбоцитами биоконструкций, а также их использованием в регенеративной медицине.

Замечания и вопросы.

1. Замечания и вопросы, относящиеся к недостаточно точному в некоторых случаях описанию материалов и методов исследования в соответствующей главе:

- В работе использовались образцы консервированной крови доноров. Не указано, какими методами осуществлялась консервация крови и сроки хранения до момента приготовления из нее необходимых тромбоцитных препаратов. Кроме того, в разделе 2.2.1 приведен перечень использованных тромбоцитных препаратов и описаны способы их приготовления из крови доноров. При этом не указано, использовались ли эти препараты сразу во всех экспериментах или хранились определенное время при каких-то условиях? Эти сведения

важны для понимания насколько исследования с применением данных препаратов были стандартизированы, а их результаты сопоставимы.

- В том же разделе 2.2.1 указано, что для получения богатой тромбоцитами плазмы с высоким содержанием лейкоцитов использовали модифицированную базовую методику. Следовало бы разъяснить суть модификации либо дать соответствующую ссылку на источник.

- В разделе 2.4.6 приведены критерии оценки состояния кожных ран у экспериментальных животных. В частности, автором анализировались плотность инфильтрации тканей клетками воспаления (клеток/мм²), плотность новообразованных сосудов (число фрагментов сосудов на 1 мм²), но при этом не описана сама процедура морфометрии. Как определялась площадь и производился учет объектов, у всех ли животных конкретной экспериментальной группы и на каком количестве срезов у каждого? Хотелось бы также понять каким способом на гистологических препаратах оценивалась миграция фибробластов в область раны?

2. Мнение автора о «росте дериватов кожи» и «миграции эпителия из придатков кожи» при стимуляции репаративной регенерации органа с помощью тромбоцит-содержащих аппликативных биопрепаратов представляется сомнительным и недоказанным. О каких дериватах и придатках кожи идет речь? Наличие волосяных фолликулов на представленных микрофотографиях (рис. 57 и 60) не являются основанием для подобных суждений. На рис. 60 не понятно в каком участке кожи находятся поперечно разрезанные волосяные фолликулы и каковы признаки их роста? Отсутствуют также объективные доказательства миграции эпителия из них. Этот раздел работы содержит другие более объективные факты, достаточные для оценки изучавшегося эффекта.

3. Термин «клетка» некорректно использовать применительно к тромбоцитам, которые, как известно, являются постклеточными структурами.

Высказанные замечания имеют рекомендательный характер, не являются принципиальными и не влияют на общую положительную оценку работы

Заключение.

Диссертация 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 крупное научное достижение, заключающееся в получении новых данных о морфофункциональных и реактивных свойствах тромбоцитов, определяющих реализацию их регенеративного потенциала. Результаты проведенных исследований могут служить основой для разработки принципиально новых подходов к созданию биологически активных препаратов, предназначенных для лечения поврежденных тканевых структур, и имеют большое значение для регенеративной медицины, гематологии, трансфузиологии, клеточной биологии.

По актуальности темы исследования, научному и методическому уровню, теоретической и практической значимости и достоверности полученных результатов диссертация Макарова Максима 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 Постановления Правительства РФ от 28.08.2017 №1024), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.22– клеточная биология.

Профессор кафедры анатомии и гистологии человека ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), доктор медицинских наук (14.00.23 – гистология, цитология, эмбриология; медицинские науки), профессор

Яцковский Александр Никодимович

119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
тел.: +7(903)7701934
e-mail: yatskovskiy_a_n@staff.sechenov.ru

Подпись профессора Яцковского А.Н. заверяю:

Ученый секретарь ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), д.м.н., профессор



Воскресенская Ольга Николаевна

12 мая 2025 года