

**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**

Поиск средств на основе тромбоцитов человека является актуальной задачей в регенеративной медицине. Большинство работ в этой области основано на оценке конечного биологического или клинического эффекта тромбоцитных препаратов, но не учитывает качество исходных тромбоцитов. Тромбоциты как полифункциональные клетки способны в зависимости от условий реализовать свой биологический потенциал в разных формах. В своей работе М.С. Макаров комплексно рассматривает большое число разнообразных аспектов при выявлении и оценке биологических характеристик тромбоцитов. Также автором делается упор на исследование морфофункциональных свойств тромбоцитов, которые могут оказаться значимыми для использования этих клеток в регенеративной медицине. В совокупности подобный подход делает работу М.С. Макарова несомненно актуальной.

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

В данном исследовании впервые проведен столь подробный морфофункциональный анализ тромбоцитов БоТП, предназначенной для использования в регенеративной медицине. В результате авторов получены новые данные об особенностях процесса быстрой активации тромбоцитов. Представляют интерес разработанные М.С. Макаровым способы активации тромбоцитов без использования стандартных индукторов. Впервые показана возможность стабилизации

тромбоцитарных гранул в адгезирующих и агрегирующих тромбоцитов. Большое значение имеют предложенные М.С. Макаровым методики стабилизации тромбоцитарных гранул с помощью наночастиц серебра, аскорбиновой кислоты, низких концентраций перекиси водорода. При этом важно, что автор выявил эффективные концентрации данных стабилизаторов. Приведена характеристика цитокинового состава тромбоцитарных препаратов, полученных разными способами, установлена корреляция между уровнем ростовых факторов в тромбоцитарном лизате и морфофункциональными параметрами исходных тромбоцитов. Разработаны новые способы получения тромбофибринового сгустка, обладающего рост-стимулирующими свойствами. Впервые *in vitro* и *in vivo* показан рост-стимулирующий эффект тромбоцитов, стабилизированных наночастицами серебра. Изучено *in vivo* влияние насыщенных тромбоцитами матриц на раневой процесс в модели поверхностного и глубокого ожога

Проведенные Макаровым М.С. исследования расширяют представления о морфофункциональных особенностях тромбоцитов, которые могут быть важными при использовании биологического потенциала тромбоцитов в регенеративной медицине. Оптимизирована методика выделения тромбоцитов из цельной крови, разработаны методы активации тромбоцитов без использования стандартных индукторов, разработан способ получения тромбофибринового сгустка с высоким содержанием ростовых факторов. Разработан способ получения тромбофибринового сгустка из неконсервированной крови, разработан способ получения бесплазменного тромбоцитарного лизата с высоким содержанием ростовых факторов, разработан подход к насыщению коллагеновых матриц стабилизированными и нестабилизированными тромбоцитами.

### **Научно-практическая значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Диссертационная работа М.С. Макарова содержит новые подходы к стимуляции активности тромбоцитов и, одновременно, к регуляции их активности, проводится обширный морфофункциональный анализ тромбоцитов при различных условиях *in vitro*. Также проводится подробное исследование рост-стимулирующего эффекта тромбоцитных препаратов в культуре диплоидных клеток, предлагаются новые подходы к созданию эффективных тромбоцитных биопрепаратов.

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 при действии «неканонических» методов 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 тромбофибринового сгустка при температуре 20-22°C с проявлением рост-стимулирующего эффекта, разработан способ получения бесплазменного тромбоцитарного лизата с высоким содержанием ростовых факторов, разработаны подходы к насыщению коллагеновых матрицсов ростовыми факторами в составе тромбоцитов.

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

Диссертационное исследование основано на изучении морфофункциональных особенностей тромбоцитов 320 доноров компонентов крови, 10 здоровых добровольцев, 80 аферезных тромбоцитных концентратов, изучении биологической активности тромбоцитов при действии различных физических и химических факторов, исследования цитокинового состава тромбоцитных препаратов, исследования эффекта тромбоцитных препаратов в культуре клеток *in vitro*, исследования эффективности тромбоцитных препаратов *in vivo* на модели экспериментального ожога IIIa степени и глубокой раны у экспериментальных животных (мыши линии Balb/c). Параллельно в работе исследовали структурную целостность коллагена в составе коллагеновых матриц и тканевых трансплантатов, которые могут быть использованы в качестве раневых покрытий, при создании биологических конструкций. В работе были использованы методики витального окрашивания клеток, световой и флуоресцентной микроскопии, морфометрии, цитометрии, иммуноцитохимии, статистического анализа. Важной частью работы является проведение большого числа исследований биологического эффекта тромбоцитов в культуре клеток человека, исследование дозозависимого эффекта тромбоцитных препаратов, который по-разному проявляется в зависимости от способа подготовки тромбоцитов и их компонентов. Достоинством работы является исследование большого числа морфологических параметров тромбоцитов, которые имеют значение для оценки степени активации тромбоцитов, интенсивности адгезии, возможности регулировать активность тромбоцитов. В работе предлагаются принципиально новые подходы к реализации регенеративного потенциала тромбоцитов, предлагаются пути для оптимизации уже известных методик получения тромбоцитных препаратов.

Диссертационная работа М.С. Макарова на тему «Биологические основы реализации регенеративного потенциала тромбоцитов человека» построена по классической схеме, изложена на 278 страницах, иллюстрирована 25 таблицами и 68 рисунками. Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций сомнений не вызывает. Список использованной литературы из 314 источников и составленный на ее основе обзор характеризуют автора как осведомленного и эрудированного специалиста. Цель и задачи исследования сформулированы конкретно и логично. Для решения задач исследования М.С. Макаров использовал комплекс современных методов, достаточный объем данных для каждой экспериментальной группы и количество групп сравнения, а также адекватно применил методы статистического анализа, что определило достоверность результатов работы. Сделанные на их основе выводы логичны.

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Результаты диссертационной работы М.С. Макарова и сделанные на их основе выводы и практические рекомендации, несомненно, обладают большим потенциалом для применения в практической медицине. Предложенные подходы к использованию регенеративного потенциала тромбоцитов могут быть использованы при производстве раневых покрытий, насыщенных факторами роста, при лечении дефектов опорно-двигательного аппарата, сосудов. Также полученные Макаровым М.С. данные расширяют представление о биологических свойствах тромбоцитах, в первую очередь тех, которые могут быть оценены микроскопически. Методики активации и стабилизации тромбоцитов могут быть использованы при работе с культурами клеток человека *in vitro*, при исследовании клеточно-тканевых конструкций и биомедицинских клеточных продуктов.

### **Замечания**

1. В главе «Материалы и методы» указано, что «Сыворотку крови получали стандартным способом путем центрифугирования цельной неконсервированной крови с ускорением 3000 g в течение 20 минут». Требуется пояснение о том, каким образом был осажен сгусток.
2. С практической точки зрения могла бы быть уместной более подробная характеристика тромбофибринового сгустка, получаемого при температуре 20-22°C, в частности, механических свойств (упругость, эластичность и т.п.).
3. Практическая рекомендация (№1) о режимах центрифугирования для получения БотП не выглядит новой, поскольку в той или иной степени именно подобные режимы центрифугирования уже используются для получения препаратов тромбоцитов из донорской крови в производственной трансфузиологии.
4. Из формулировки практической рекомендации о получении тромбоцитарного геля и тромбофибринового сгустка (№8) целесообразно убрать указание на конкретный лекарственный препарат «Адреналина гидрохлорид-Виал» и заменить более общей фразой об использовании раствора адреналина гидрохлорид с определенной концентрацией.

Тем не менее, сделанные замечания не имеют принципиального значения и не ставят под сомнение научную новизну и практическую значимость исследования М.С. Макарова.

### **Заключение**

Таким образом, диссертация Макарова Максима Сергеевича является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований изучены морфофункциональные и другие биологические особенности тромбоцитов, которые влияют на реализацию их регенеративного потенциала, что можно квалифицировать как решение научной проблемы в области разработки тромбоцитных препаратов для

стимуляции роста клеток и лечения тканевых дефектов, имеющей важное социальное значение.

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.

Ройтман Евгений Витальевич,  
доктор биологических наук  
(по специальности 3.1.28 – гематология и трансфузиология),  
профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии  
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России  
117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1  
roitman@hemostas.ru

Подпись Ройтмана Е.В. заверяю:

Ученый секретарь  
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова  
Минздрава России  
к.м.н., доцент



Демина Ольга Михайловна

4 мая 2023 года