

Отзыв официального оппонента

на диссертацию Ламзина Ивана Михайловича «Динамика структурно-функциональных показателей эритроцитов трансфузионной среды в процессе хранения по данным атомно-силовой микроскопии», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.01.02 – биофизика

Эффективность контроля качества компонентов крови является одной из важнейших проблем в современной трансфузиологии. В соответствии с Техническим регламентом РФ (2010) стандартными методами определения пригодности трансфузионных сред, содержащих эритроциты, являются непрямые тесты на уровень свободного гемоглобина, определение гематокрита и ряд других методов. Однако с помощью этих методов возможна только косвенная оценка состояния эритроцитов, не подвергшихся гемолизу, что не позволяет судить об их структурной и функциональной полноценности. Данных, посвящённых изучению изменений биофизических свойств эритроцитов, возрастной гетерогенности популяции консервированных эритроцитов в процессе длительного хранения мало. Поэтому тема диссертационной работы И.М. Ламзина, цель которой состоит в установлении динамики изменений модуля Юнга и морфометрических показателей эритроцитов образцов трансфузионной среды в процессе хранения с использованием современного метода сканирующей атомно-силовой микроскопии (АСМ), является безусловно актуальной.

В отличие от публикаций других авторов на близкую тему, предметом исследования И.М. Ламзина является не просто измерение параметров эритроцитов при некоторых выбранных условиях, а комплексное исследование динамики большого числа показателей различных форменных элементов цельной крови и эритроцитарной массы, подготовленной к хранению в стандартизированных условиях и на разных этапах её хранения.

Другая специфическая черта работы заключается в том, что для исследования используется не только стандартные и утвержденные подходы и

методы, но также супер-современный метод АСМ, применение которого в трансфизиологии ещё не стандартизовано, что требует дополнительных научных исследований с позиций биофизики, чему и посвящена данная работа.

Задачи, поставленные и решенные в диссертации И.М. Ламзина, предмет и методы исследования, полученные результаты и выводы полностью соответствуют паспорту специальности 03.01.02 - биофизика (медицинские науки).

Диссертация И.М. Ламзина состоит из введения и основной части, содержащей 3 главы, выводы и практические рекомендации, а также списка цитируемой литературы, включающего 168 наименований. Диссертация содержит 47 рисунков и 12 таблиц, ее объем составляет 132 страницы.

В Введении обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, отмечены научная новизна и практическая значимость, личный вклад автора и достоверность полученных результатов, приведены положения, выносимые на защиту.

Первая глава диссертации имеет обзорный характер. Детально обсуждаются основные принципы АСМ и области её применения в биомедицинских исследованиях. Далее анализируются литературные данные об изменениях структурно-функциональных показателей эритроцитов крови человека и биофизических свойств их мембраны в процессе онтогенеза. Обсуждаются современные подходы к определению качества эритроцитсодержащих сред.

Вторая глава посвящена материалам и методам исследования, здесь приведены описания протоколов подготовки препаратов крови для измерений, в частности, цельной крови и эритроцитсодержащей среды, состав которой значительно отличается от состава цельной крови. Подчеркивается, что гематологические исследования проводились на основе стандартных для современной службы крови методов, стандартными анализаторами и приборами по утвержденным методикам. Наряду со стандартными

гематологическими исследованиями для оценки состояния эритроцитов из проб цельной крови и трансфузионной среды готовились цитологические препараты для сканирования с помощью АСМ с использованием метода Герца по запатентованной автором диссертации методике. По результатам 3371 сканирования в 9-ти точках каждой из 5-ти клеток из 235 отобранных образцов рассчитывались модули Юнга (МЮ) мембран эритроцитов. Результаты измерений обрабатывались статистически с использованием лицензионных программ.

В третьей главе описаны результаты собственных исследований автора. Наиболее важными достижениями автора нам представляется, во-первых, то, что было выявлено статистически значимое снижение средних значений МЮ эритроцитов образцов цельной крови человека в процессе приготовления эритроцитсодержащих сред и отмечено смещение границ и ширины интервала значений МЮ. Эти изменения можно объяснить воздействием на мембрану специфического антикоагулянта CPDA-1, принятого для подготовки образцов крови для хранения в данной лаборатории. Кроме этого не исключено воздействие процедуры сепарации жидкой части плазмы и лейкоцитарно-тромбоцитарного слоя в процессе этой подготовки.

Во-вторых, важным представляется установление того факта, что в результате хранения концентрированной крови в течение максимально допустимого срока – 35-ти суток происходит почти 2-х кратный рост МЮ эритроцитов, а также существенное повышение гетерогенности эритроцитарных популяций по этому биофизическому параметру, которое следует рассматривать как маркер старения эритроцитов трансфузионных сред. Представляет интерес также прослеживание динамики этих измерений с увеличением срока хранения (1, 7, 14, 21 и 35 суток).

Интересной особенностью работы является то, что использование АСМ позволило также оценить и динамику изменений формы эритроцитов в образцах трансфузионной среды различного срока хранения. При этом измерялись два морфометрических параметра – диаметр и толщина клеток. Измерения показали постепенное статистически значимое снижение средних значений диаметра эритроцитов и рост средних значений их толщины.

В четвертой главе приводится обсуждение сути полученных результатов и их важности для развития трансфузиологии. Подчеркивается, что анализ стандартных методов показывает, что они могут лишь косвенно характеризовать свойства консервированных эритроцитов. Это тем более важно, что использование автоматических анализаторов для исследования качественных параметров трансфузионной среды различного срока хранения, оценки функциональных и морфометрических показателей её эритроцитов демонстрирует ряд проблем. Во-первых, это трудности в толковании полученных результатов с учётом того факта, что автоматические гематологические анализаторы предназначены для анализа проб цельной крови, от которой эритроцитсодержащие среды существенно отличаются, как по составу, так и по свойствам. Во-вторых, несмотря на явные изменения уровня гемолиза, фактического старения клеток и изменения состава эритроцитарных популяций, динамика значений основных показателей, таких как концентрация лейкоцитов, лимфоцитов, эритроцитов и уровень гематокрита, не выявляют статистической значимости при проведении однофакторного дисперсионного анализа. Полученные данные делают проблематичным толкование корректности использования стандартных методов оценки качества сред, по своему составу отличающихся от цельной крови.

Вопрос о корректности существующих методов определения качества образцов трансфузионной среды в процессе и хранения диктует необходимость поиска новых критериев оценки качества. Ведущая роль в выполнении основных функций эритроцитов, как и их устойчивости к изменению формы, отводится состоянию мембраны. Одними из основных характеристик

мембраны являются её упругость и форма. Выполненная диссертантом работа показывает, что в определённой мере такой комплекс показателей можно исследовать самым современным методом – атомно-силовой микроскопией. Она позволяет измерить не только упругость отдельных эритроцитов, но и их диаметр, толщину, оценить форму клетки.

Научная новизна работы заключается в применении метода АСМ для исследования динамики изменений модуля Юнга и морфометрических показателей эритроцитов образцов трансфузионной среды в процессе хранения. Обнаруженные новые изменения свидетельствуют о том, что процесс старения консервированных эритроцитов отличается от ортогенеза эритроцитов, циркулирующих в сосудах человеческого организма. Также автором впервые показано, что использование АСМ позволяет проследить в динамике сопряженные изменения МЮ эритроцитов, морфометрических показателей и структуры популяции трансфузионной среды. Обоснована возможность использования полученных данных в качестве референсных значений динамики МЮ эритроцитов образцов трансфузионной среды. Приоритентность исследований подтверждена патентом РФ № 2542438 от 21.01.2015 года.

Представленная работа имеет высокую **практическую значимость**, определяемую перспективами применения полученных автором данных об изменении морфометрических и биофизических показателей эритроцитов в процессе консервации и хранения в качестве эффективных критериев дополнительного метода исследования образцов трансфузионной среды в службе крови. Анализ изученных параметров даёт основания для оптимизации сроков и условий хранения контейнеров в банках крови трансфузиологической службы.

По диссертационной работе имеются следующие **замечания**:

а) При описании методики проведения измерений не указано, как проводился выбор точек измерения (9 шт.) на поверхности каждой клетки. Это тем более важно, что интервал изменений в процессе хранения измеренных

значений толщины клеток указан как $0.49 \pm 0.09 \dots 0.65 \pm 0.13$ мкм. Эти значения скорее всего соответствуют исключительно положению впадины дискоцита, однако об этом следовало сказать явно. Далее к этому же – с учетом указанных изменений формы клеток в процессе хранения с нарастанием сферичности вызывают некоторое удивление сравнительно низкие значения стандартных отклонений от средней толщины клеток ($0.09\dots 0.13$) мкм.

б) Найденный в работе интервал изменений в процессе хранения измеренных значений диаметра клеток указан как $9.67 \pm 0.55 \dots 7.59 \pm 1.07$ мкм, что выглядит весьма странно. Исходные значения, соответствующие клеткам здорового человека, свежевзятым из организма, не вписываются в хорошо известное распределение Прайс-Джонса, и этот факт не обсуждается. На наш взгляд он требует обсуждения и объяснения.

в) В Выводах 1 и 2 говорится о том, что исходные значения модуля Юнга эритроцитов, определённые с помощью АСМ (3.23 ± 0.02 кПа), с удивительной точностью совпадают с конечными значениями после 35 суток хранения (3.23 ± 0.02 кПа). Это совпадение достойно специального обсуждения.

г) Хотя работа написана в целом хорошим языком без использования жаргона и в хорошем стиле, в ней имеются некоторые досадные погрешности. Так, автору не следовало вводить нестандартное написание единицы измерения модуля Юнга кПа вместо стандартного кПа. Далее, при указании уровня статистической значимости не следовало указывать выдаваемое некоторыми приборами значение $p < 0.000$, как не имеющее смысла.

Указанные замечания не имеют принципиального характера и не снижают общей высокой оценки работы, представляющей собой завершённое научное исследование. Основные результаты доложены на международных и всероссийских научных и научно-технических конференциях, опубликованы в виде ряда статей в рецензируемых российских и международных научных журналах. Полученные результаты

обладают научной новизной и достоверностью, выводы обоснованы. Ключевой личный вклад автора в данное исследование не вызывает сомнений. Автореферат и публикации автора полностью отражают содержание диссертации.

В целом, по своей актуальности, научной новизне и практической значимости представленная диссертация отвечает всем требованиям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г., № 842, и является научно-квалификационной работой, в которой решена задача установления динамики изменений модуля Юнга и морфометрических показателей эритроцитов образцов трансфузионной среды в процессе хранения с использованием современного метода сканирующей атомно-силовой микроскопии, имеющая важное значение для развития биофизики. Ламзин Иван Михайлович заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

04.09.2017 г.

Официальный оппонент



Приезжев Александр Васильевич

кандидат физико-математических наук, доцент кафедры общей физики и волновых процессов Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет, кафедра общей физики и волновых процессов.

Телефон: +7(495)939-1225. Факс: +7(495)939-3113. E-mail: avp2@mail.ru

Декан физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

профессор



Сысоев Николай Николаевич