

ОТЗЫВ

официального оппонента, Михайличенко Вячеслава Юрьевича, доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой общей хирургии Медицинской академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ имени В.И. Вернадского» на диссертацию Перенесенко Анастасии Олеговны «Механизмы формирования тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов при хроническом обструктивном пиелонефрите», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук в специализированный ученый совет Д 01.022.05 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Донецкий государственный медицинский университет имени М. Горького» Министерства здравоохранения Российской Федерации (далее – ФГБОУ ВО ДонГМУ Минздрава России) по специальности 3.3.3. Патологическая физиология

1. Актуальность темы

Актуальной проблемой патофизиологии является патогенез перехода хронического воспаления в острую фазу пиелонефрита при обструктивном пиелонефрите и, соответственно, установление критериев, позволяющих дифференцировать фазы рецидива и ремиссии заболевания при инфицировании мочевыводящих путей (МВП). Традиционными критериями выраженности и скорости развития воспалительной реакции считаются гематологические показатели, а именно лейкоцитоз, лейкоцитарная формула крови, СОЭ, уровень С-реактивного белка. Продолжают обсуждаться характеристики тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА) в контексте анализа механизмов рекрутирования клеток крови из сосудистого русла в ткани МВП и поиска ранних маркеров выраженности воспаления. В этой связи, требуют исследования фенотипы клеток крови и механизмы формирования межклеточных взаимодействий тромбоцитов и лейкоцитов в фазе ремиссии и рецидива хронического обструктивного пиелонефрита (ХОПН). Вполне логично, что соискатель рассматривает рецепторный

аппарат тромбоцитов и лейкоцитов как информативный индикатор влияния нефролитиаза и механизмов регуляции компенсаторных реакций клеток крови при реализации воспаления. Поскольку выделенные тромбоциты являются оптимальной моделью для оценки статуса функциональной системы клеток-мишеней, включающих рецептор– пути внутриклеточной сигнализации, то методический подход моделирования механизмов развития воспалительной реакции *in vitro* представляется оригинальным, корректным и информативным.

Таким образом, необходимость изучения характеристик и механизмов формирования ТЛА, а также – разработки информативных методов оценки выраженности воспаления в МВП при нефролитиазе определяют актуальность представленной научной задачи. Работа имеет как теоретическое, так и практическое значение.

2. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, а также достоверность полученных результатов

Исследования А.О. Перенесенко выполнены на высоком методическом уровне с использованием комплекса современных клинично-инструментальных, биохимических и статистических методов исследования. Достоверность полученных результатов и выводов определяется достаточным объемом фактического материала (исследовано 195 больных с хроническим обструктивным пиелонефритом), корректным статистическим анализом результатов, использованием информативных методов визуализации конкрементов, а также объективных клинично-лабораторных показателей, отражающих тяжесть пиелонефрита. Диссертантом выполнено современное, весьма информативное, исследование *in vitro* чувствительности рецепторов тромбоцитов (Тц) и механизмов формирования ТЛА. Данный методический подход позволил впервые выделить фенотипы клеток крови, участвующих в формировании агрегатов, в зависимости от индивидуальной реактивности организма. Использование характеристик агрегатограмм для анализа путей

внутриклеточной сигнализации Тц, участвующих в формировании ТЛА, представляется клинически востребованным подходом для оценки развития воспалительной реакции. Для верификации механизмов образования ТЛА и рекрутирования лейкоцитов из сосудистого русла в ткани МВП, оценивалась активность $\alpha 2$ -адренорецептора, пуриновых P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора, роль которых в регуляции клеток крови при воспалении не вызывает сомнений. Используемые в работе методики являются оригинальными, обеспечивают решение сформулированных задач, отражают современный методический уровень научных исследований в патофизиологии почек и мочевыводящих путей. К обсуждению привлечено достаточное количество публикаций (297 литературных источников). Достоверность и воспроизводимость полученных результатов подтверждается корректным использованием методов биостатистики.

Достаточный фактический материал и методически выверенный анализ результатов позволили соискателю получить достоверные данные, выяснить закономерности формирования межклеточных коопераций тромбоцитов и лейкоцитов у больных с хроническим обструктивным пиелонефритом и сформулировать аргументированные выводы.

3. Структура и содержание диссертации, соответствие требованиям по оформлению диссертации и автореферата

Диссертация изложена на 193 страницах и состоит из введения, пяти разделов (включая обзор литературы, материал и методы исследования, 3-х глав собственных исследований), анализа и обобщения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, который содержит 297 наименования (80 кириллицей и 217 латиницей). Диссертация содержит 33 таблицы и иллюстрирована 32 рисунками.

Введение написано в соответствии с современными требованиями к кандидатским диссертациям. В представленном разделе освещается современное состояние изучаемой научной задачи, мотивируется

актуальность темы, отражается связь диссертационной работы с научными программами университета, формулируются цели и задачи исследования, конкретизируются объект, предмет и методы исследования, обосновывается научная новизна и практическая значимость полученных результатов, определяется личный вклад автора, приводятся сведения об апробации результатов и количественные данные об объеме и структуре публикаций по теме диссертации. Приведен перечень 14 научных конференций, на которых были обсуждены результаты выполненной диссертационной работы.

Обзор литературы состоит из 3-х подразделов, в которых на основе анализа источников литературы приведены факты, касающиеся молекулярных паттернов активации воспалительного процесса в почке и мочевыводящих путях; описаны этапы формирования межклеточных коопераций и роль тромбоцитов в индукции воспаления. Благодаря критическому анализу литературы соискатель определил малоизученные аспекты выбранной научной темы и сформулировал задачи исследования.

Далее в диссертации представлена информация, касающаяся **материала и методов исследования**, критериев отбора и исключения больных, приведена характеристика групп обследованных пациентов.

Основную группу исследования составили 195 пациентов с визуализационными признаками наличия конкрементов в верхней и средней трети мочеточника; группа контроля включала 15 практически здоровых добровольцев, проходивших диагностическое обследование и не страдающих сердечно-сосудистой и урологической патологией. В главе представлены показатели анализа крови; характеристики агрегатограмм; методика визуализации и оценки количества тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов; методы статистической обработки результатов. Можно констатировать, что использованные автором методы исследования позволяют достигнуть поставленную цель и решить задачи исследования.

Данные собственных исследований представлены в трех-главах. В третьей главе *«Информативность и специфичность лабораторных*

показателей в диагностике фаз хронического обструктивного пиелонефрита» приведены результаты клинико-лабораторной диагностики пиелонефрита; доказано, что причиной, выявленной гетерогенности значений индикаторов воспаления у пациентов с ХОПН может быть индивидуальная реактивность организма, связанная с полом и возрастом. Изучена валидность маркеров воспаления в диагностике фаз ремиссии и рецидива у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом. Построение однофакторных моделей позволило установить пороговое значение основных лабораторных индикаторов воспаления, при котором возможно прогнозирование риска развития острой воспалительной реакции в МВП. Подтверждена информативность количества тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов в крови для оценки раннего этапа воспаления.

Четвертая глава собственных результатов исследования *«Молекулярные механизмы формирования тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов при реализации острого и хронического воспаления в мочевыводящих путях»* содержит информацию, касающуюся механизмов взаимодействия клеток крови в физиологических условиях (здоровые волонтеры) и при нефролитиазе. Установлено, что у здоровых лиц стимулирующий эффект адреналина на клетки крови существенно не влиял на формирование ТЛА, тогда как АДФ и ФАТ воспроизводили сопоставимое количество агрегатов. По сути, установлено, что при индукции воспаления у здоровых лиц паракринные механизмы играют основную роль во взаимодействии Тц и лейкоцитов (Лц). Подтверждено увеличение количества ТЛА в фазе ремиссии и рецидива ХОПН, что подтверждает включение компенсаторных реакций клеток крови при развитии воспаления. Выяснение механизмов активации клеток крови при формировании ТЛА в разных фазах ХОПН позволит приблизиться к пониманию причин рецидива острого воспаления в МВП. Впервые показано, что у пациентов в фазе рецидива и ремиссии ХОПН присутствуют специализированные фенотипы клеток крови, определяющие индивидуальные особенности формирования ТЛА и развития

воспалительной реакции в МВП. Практически значимым результатом является доказательство, что различная реактивность клеток крови в фазе ремиссии и рецидива ХОПН позволяет мониторить развитие и моделировать регуляцию воспалительной реакции *in vitro*.

В рамках **пятой главы** «Характеристики функциональной активности тромбоцитов при формировании тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов у пациентов с ХОПН» диссертантка изучила механизмы активации и кинетику процесса агрегации Тц, предшествующие взаимодействию с лейкоцитами. Подтверждено что степень активации Тц может рассматриваться как наиболее ранний индикатор рекрутирования лейкоцитов, а спектр агонистов и реакция на них (патогенетические факторы, индуцирующие активацию Тц) позволяют оценить риски развития острого воспаления. Установлено, что характеристики агрегатограммы (Lag-time, Slope, AUC) при активации Тц, связаны с количеством и составом лейкоцитов, принимающих участие в воспалительной реакции. Дана трактовка роли Тц в функционировании разных фенотипов клеток крови, участвующих в формировании ТЛИА, у пациентов с ХОПН.

В разделе «Анализ и обобщение результатов исследования» проведено сопоставление собственного фактического материала с данными литературы. Это позволило диссертанту корректно проанализировать механизмы активации Тц и Лц, обосновать спектр рецепторов для анализа механизмов формирования межклеточных коопераций клеток крови в фазе ремиссии и рецидива ХОПН; верифицировать внутриклеточную сигнализацию в Тц при развитии воспалительной реакции в МВП; интерпретировать наличие фенотипов клеток крови как отражение индивидуальной реактивности организма в кинетике воспалительной реакции. Диссертант продемонстрировал созвучность собственных результатов с известными литературными данными, приведены аргументы, свидетельствующие о новизне полученных результатов.

Выводы диссертации в количестве 6-ти соответствуют поставленным задачам исследования, отражают полученные результаты, достоверны и являются новыми.

4. Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах. Результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на 14 конференциях и форумах. Содержание опубликованных 26 работ в полной мере освещает основные результаты исследований, проведенных соискателем по теме диссертации, а также их актуальность и значение для практической медицины.

5. Новизна исследования и полученных результатов. Диссертантом использован комплексный подход к изучению патогенеза пиелонефрита при мочекаменной болезни, основанный на установлении молекулярных механизмов формирования тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов.

Доказано, что исследование клеток крови *in vitro* является репрезентативной моделью для оценки развития воспалительной реакции, а также установления механизмов регуляции взаимодействия клеток крови при нефролитиазе. Впервые доказано, что в фазе ремиссии и рецидива ХОПН формирование ТЛА и рекрутирование лейкоцитов из сосудистого русла достигается посредством стимуляции α_2 -адренорецептора, пуриновых P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора. Подтверждено, что индивидуальная реактивность организма при ХОПН проявляется наличием гипо-, нормо- и гиперреактивного фенотипов клеток крови, отличающихся реакцией на провоспалительные стимулы (адреналин, АДФ и ФАТ). Впервые идентифицированы пути внутриклеточной сигнализации, обеспечивающие модуляцию функциональной активности Тц на этапе формирования ТЛА, что предопределяет развитие воспалительной реакции в МВП. Определена роль адренергической регуляции компенсаторной реакции Тц при наличии хронического воспалительного процесса в МВП. Впервые установлено

участие пуринергической сигнализации в Тц в механизмах рекрутирования Лц при остром пиелонефрите.

6. Значимость результатов работы для науки и практики

Проведенное исследование способствовало созданию концепции инициации и ограничения воспалительной реакции, обусловленной индивидуальной реактивностью организма у пациентов с ХОПН. Разработанные методы исследования взаимодействия клеток крови при воспалении позволяют анализировать механизмы развития острой и хронической воспалительной реакции, состав агрегатов, контролировать и корректировать эффективность лечебных мероприятий у пациентов с ХОПН; прогнозировать риск развития острого пиелонефрита с учетом индивидуальной реактивности организма пациента. Полученные данные позволяют повысить информативность диагностических исследований и могут рассматриваться как факторы прогнозирования риска инициации и перехода фаз ХОПН с учетом индивидуальной реактивности организма пациента.

7. Идентичность содержания автореферата и основных положений диссертации.

Диссертация А.О. Перенесенко и автореферат оформлены в соответствии с основными требованиями к работам, представляемым на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Структура автореферата в полной мере отражает структуру диссертации, а содержание автореферата с освещает основное содержание диссертационной работы.

8. Замечания и пожелания к диссертации и автореферату по их содержанию и оформлению.

Каких-либо принципиальных замечаний по диссертационной работы А.О. Перенесенко нет. Высоко оценивая работу в целом, уместно уточнить ряд вопросов и сделать некоторые замечания. Итак, **замечания:**

1. Общее замечание касается оформления диссертационной работы. Отдавая должное иллюстративной части работы, нельзя не обратить внимание

на выпадающие из общей картины таблица 5.2. (сложная для анализа), так и рисунки 4.2. и 4.4. цифровой материал которых трудно сопоставить.

2. В работе недостаточно внимания уделено анализу регуляции функциональной активности лейкоцитов.

3. В трактовке модулирующих эффектов адреналина имело бы смысл обсудить роль индивидуального соотношения α -, β -адренорецепторов при формировании ТЛА.

Также хотелось бы услышать ответы диссертанта на следующие вопросы:

1. Какие новые диагностические возможности открывает анализ ТЛА?

2. Могли бы Вы кратко сформулировать особенности механизмов пуринергической сигнализации, модулирующей формирование ТЛА в фазе ремиссии и рецидива ХОПН?

3. С чем может быть связано участие различных индукторов в фенотипах клеток крови в фазе ремиссии и рецидива ХОПН?

Еще раз надо подчеркнуть, что принципиальных замечаний по диссертации А.О. Перенесенко нет и работа оставляет весьма хорошее впечатление.

9. Вывод. Диссертация Перенесенко Анастасии Олеговны «Механизмы формирования тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов при хроническом обструктивном пиелонефрите», выполненная в ФГБОУ ВО ДонГМУ Минздрава России, является законченной научной работой, содержащей решение важной научной задачи – изучить молекулярные механизмы инициации и ограничения воспаления, обусловленные индивидуальной реактивностью организма, у пациентов с ХОПН, что позволит персонифицировать схему консервативной терапии пиелонефрита посредством модуляции внутриклеточной сигнализации тромбоцитов и лейкоцитов.

По актуальности, обоснованности полученных результатов, теоретическому и практическому значению, научной новизне, соответствию содержания и выводов, сформулированной цели и задачам – диссертационная работа Перенесенко Анастасии Олеговны «Механизмы формирования тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов при хроническом обструктивном пиелонефрите» полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. №748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. №1024, от 01.10.2018 г. №1168, от 11.09.2021 г. № 1539), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология.

Заведующий кафедрой общей хирургии, анестезиологии-реаниматологии и скорой медицинской помощи Ордена трудового Красного знамени Медицинский институт имени С. И. Георгиевского», заведующий Хирургическим отделением Клинического медицинского многопрофильного центра Святителя Луки ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского» Министерства образования и науки РФ, д.м.н., профессор, лауреат Государственной премии Украины в области науки и техники, академик РАЕ В.Ю. Михайличенко

295051, РФ, Респ. Крым, г. Симферополь, б-р Ленина, 5/7

Ордена трудового Красного знамени Медицинский институт имени С. И. Георгиевского»

ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского»

Тел.: 8(3652)554-911, e-mail pancreas1978@gmail.ru

Подпись доктора медицинских наук, профессора В.Ю. Михайличенко заверяю.



В.Ю. Михайличенко
Ученый секретарь
Федерального научного университета
им. В.И. Вернадского