УТВЕРЖДАЮ

Врио генерального директора
ФГБУ ФНКЦ ФХМ
им. Ю.М. Лопухина ФМБА России
д.б.н. Лазарев Василий Николаевич

_____

«9» июня 2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины им. Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России) – о научно-практической значимости диссертационной работы Фильковой Александры Андреевны «Исследование феномена обратимой агрегации тромбоцитов человека и разработка методики диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на его основе» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.2. Биофизика, 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

Актуальность темы выполненной работы

Тромбоциты выполняют в норме защитную функцию по предотвращению кровотечения в месте повреждения кровеносного сосуда. В месте повреждения тромбоциты активируются, агрегируют, образуют первичный белый тромб, а затем, в результате свертывания крови, формируется конечный тромб. Однако еще в конце прошлого века было обнаружено явление спонтанной дезагрегации тромбоцитов. Было установлено, что агрегация тромбоцитов, индуцированная слабыми агонистами (АДФ, серотонин, адреналин), часто носит обратимый характер, при котором наблюдается частичное или полное разрушение агрегатов. Есть данные, свидетельствующие, что большую роль в этом процессе играет концентрация ионов кальция в суспензии, однако молекулярные механизмы данного явления до конца не исследованы.

Диссертационная работа Фильковой А.А. посвящена изучению обратимой агрегации тромбоцитов и разработке на его основе методики диагностики

состояния тромбоцитарного гемостаза. Учитывая, что изучение роли ионов кальция в процессе дезагрегации тромбоцитов важно для понимания механизмов функциональной активности тромбоцитов, работу следует признать актуальной.

Общая характеристика и структура диссертационной работы

Структура диссертации Фильковой А.А. традиционна. Она изложена на 118 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов. Работа содержит 44 рисунка и 3 таблицы, также включает список литературы, состоящий из 159 литературных источников.

Во Введении приведены разделы, описывающие актуальность исследования, степень разработанности темы, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, также здесь приведены цель и задачи исследования.

Глава 1 – Обзор литературы, в котором приведены сведения о закономерностях свертывании крови, физиологических функциях тромбоцитов, изложены основные методы определения функциональной активности тромбоцитов, описано явление обратимой агрегации тромбоцитов. В целом обзор литературы достаточно емкий, содержит последние данные в исследуемой области.

В главе 2 – Материалы и методы – описаны использованные в работе методы. Следует отметить, что автор владеет современными методами исследования, таким как флуоресцентная микроскопия, проточная цитометрия, оптическая турбидиметрия. Использованные автором методы адекватны поставленным задачам.

Результаты и их обсуждение представлены в главе 3 и главе 4. В этих главах описаны полученные в ходе решения поставленных задач теоретические и экспериментальные данные, проведен их анализ, обсуждены возможные направления дальнейших изысканий в исследуемой области. В работе предложен молекулярный механизм, позволяющий объяснить явление обратимой агрегации. Несмотря на многочисленные гипотезы, механизм этого явления до сих пор неизвестен. Предполагается, что к разрушению агрегатов может приводить: (1) инактивация рецептора фибриногена (гликопротеина IIb-IIIa) через некоторое время после его активации; (2) снижение концентрации агониста АДФ на поверхности тромбоцитов под действии нуклеаз. Автор считает, что обратимая агрегация тромбоцитов в присутствии ионов кальция (1–2мМ) в среде обусловлена ингибированием синтеза тромбоксана А2 (ТхА2). Этот вывод делается на основании того, что в суспензии тромбоцитов, инкубированных с аспирином (ингибитором циклооксигеназы), наблюдается обратимая агрегация; прямое измерение показало уменьшение концентрации ТхА2. Автор предполагает, что синтез тромбоксана А2 инициируется фосфолипазой А2γ,

активность которой, в свою очередь, связана с процессом опустошения внутриклеточных кальциевых депо в тромбоцитах. В отсутствие внеклеточного кальция эти депо не пополняются, что приводит к продукции тромбоксана А2, который дополнительно активирует тромбоциты, стабилизируя агрегаты.

Последняя глава работы – Заключение – описывает суть полученных результатов и содержит выводы по проделанной работе.

По результатам, представленным в диссертационной работе, опубликованы 10 статьей в рецензируемых журналах, представлены тезисы докладов на 6 российских и международных конференциях.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

Научная новизна работы определяется разработкой методики диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на основе механизма дезагрегации тромбоцитов в присутствии ионов кальция в суспензии. Эта методика позволяет оценить способность тромбоцитов пациента к обратимой агрегации тромбоцитов, которая является важным показателем состояния гемостаза и может быть нарушена при различных заболеваниях, таких как тромбозы и геморрагические диатезы. Предложенная методика позволяет оценить не только степень агрегации тромбоцитов, но и их способность к обратимой агрегации, что является чувствительным показателем состояния гемостаза.

Исследования, проводимые Фильковой А.А., могут улучшить диагностику тромбоцитопений и помочь в разработке индивидуальных подходов к лечению пациентов с этими заболеваниями, а также могут быть использованы в фармацевтической отрасли при создании новых антиагрегантов.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Примененные автором методы изучения агрегации тромбоцитов адекватны поставленным задачам. Сделанные выводы обоснованы и подтверждены экспериментальными данными, достоверность которых подтверждена статистическим анализом. Представленные в автореферате и публикациях результаты отражают проведенные диссертантом исследования.

Однако диссертация содержит немало неточностей и неясностей, которые усложняют чтение.

(1) На нескольких рисунках в качестве показателя агрегации тромбоцитов использована оптическая плотность, эта величина указана в процентах (рис. 15, 16, 21, 25, 28). Это странно, так как оптическая плотность безразмерная величина.

(2) На многих рисунках фигурируют отрицательные значения светопропускания, что формально свидетельствует о генерации света в исследуемом образце. Это

нонсенс.

(3) Некоторые данные, представленные на рисунках, сопровождаются неточными сведениями. Так, например, вместо указания концентрации ионов кальция написано «физиологические значения». Сложно понять подписи к рис. 30 и 31: «СТ+Са – суспензия тромбоцитов с ионами кальция или БТП с гирудином». Если в этой серии экспериментов объединены данные, полученные и на суспензии отмытых тромбоцитов и на БТП, то встает вопрос о корректности такого объединения. Известно, гирудин препятствует реакции выброса содержимого внутриклеточных гранул. В связи с этим наблюдаемую дезагрегацию в серии с БТП и гирудином (рис.22) можно связать с подавлением реакции высвобождения.

(4) В работе получено (вывод 1), что снижение концентрации тромбоцитов в суспензии сокращает время дезагрегации тромбоцитов, а при понижении температуры инкубации тромбоцитов время дезагрегации и максимум светопропускания снижаются. Удивительно, что эти результаты не сопоставлены с известными данными по влиянию температуры и концентрации клеток на агрегационную способность тромбоцитов.

(5) В работе имеются данные по компьютерному моделированию кинетики обратимой агрегации тромбоцитов. Однако эти данные не используются при обсуждении результатов, не отражены в выводах.

(6) Следует отметить недопустимую небрежность в оформлении автореферата: текст о научной новизне на стр.5 полностью совпадает с разделом «Выводы».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Фильковой Александры Андреевны «Исследование феномена обратимой агрегации тромбоцитов человека и разработка методики диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на его основе» является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи по исследованию обратимой агрегации тромбоцитов и разработке методики диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на его основе, имеющей существенное значение для биофизики и клинической лабораторной диагностики. По новизне, актуальности решаемых задач, объему и методическому уровню проведенных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Фильковой А.А. соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждении 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 специальностям 1.5.2.

Биофизика, 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на заседании отдела биофизики ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА России (протокол № 5 от «24» мая 2023 г.).

Составитель отзыва Мурина Марина Алексеевна, доктор биологических наук, профессор (по специальности «биофизика»), главный научный сотрудник отдела биофизики Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины им. Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства.

Рабочий тел. +7 (499) 246-43-52;
e-mail: marina_murina@mail.ru _____ (М.А. Мурина)

Подпись Муриной М. А. заверяю
Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,
кандидат биологических наук

_____ (О.П. Лихнова)

08.06.2023

Сведения о ведущей организации

о ведущей организации по диссертационной работе Фильковой Александры Андреевны на тему «Исследование феномена обратимой агрегации тромбоцитов человека и разработка методики диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на его основе», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 Биофизика и 3.3.8 Клиническая лабораторная диагностика

Полное наименование организации:	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»
Сокращенное наименование организации:	ФГБУ ФНКЦ ФХМ 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. – Т. 44. – С. 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. – Т. 9. – №. 6. – С. 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. – Т. 9. – №. 6. – С. 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. – Т. 10. – С. 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.