ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 99.1.098.02, СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ЦЕНТРА ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК, ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ДЕТСКОЙ ГЕМАТОЛОГИИ, ОНКОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ ИМЕНИ ДМИТРИЯ РОГАЧЕВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело №_____

решение диссертационного совета от 27 июня 2023 года № 4

О присуждении Фильковой Александре Андреевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Исследование феномена обратимой агрегации тромбоцитов человека и разработка методики диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на его основе» по специальностям 1.5.2. Биофизика, 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика принята к защите 18.04.2023 года (протокол заседания №2) диссертационным советом 99.1.098.02, созданным на базе федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, 109029, г. Москва, Средняя Калитниковская ул., д. 30, федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117998, г. Москва, ул.

Саморы Машела, д. 1, приказ Министерства науки и высшего образования Российской Федерации №1690/нк от 7 декабря 2022 года.

Соискатель Филькова Александра Андреевна, 29 сентября 1995 года рождения, в 2019 году с отличием окончила магистратуру федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» с присвоением степени магистра по направлению 03.04.02 «Физика». С 2019 г. по 2022 г. обучалась в аспирантуре при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации по направлению подготовки научно-педагогических кадров 06.06.01 Биологические науки по профилю, соответствующему научной специальности 1.5.2. Биофизика.

Работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии ФГБУН ЦТП ФХФ РАН, г. Москва.

Диссертация выполнена в лаборатории клеточной биологии и трансляционной медицины федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации и лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук.

Научные руководители – Свешникова Анастасия Никитична, доктор физико-математических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, лаборатория внутриклеточной сигнализации и системной биологии, заведующий лабораторией.

Плясунова Светлана Александровна, кандидат медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, клинико-диагностическая лаборатория, заведующий лабораторией.

Официальные оппоненты:

Миндукшев Игорь Викторович, доктор биологических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, лаборатория сравнительной физиологии дыхания, главный научный сотрудник;

Лобов Геннадий Иванович, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, лаборатория физиологии сердечно-сосудистой и лимфатической систем, заведующий лабораторией, – дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», г. Москва, в своем положительном отзыве, подписанном Муриной Мариной Алексеевной, доктором биологических наук, профессором, главным научным сотрудником отдела биофизики, обсужденном на заседании данного отдела (протокол № 5 от 24 мая 2023 года) и утвержденном врио генерального директора, доктором биологических наук Лазаревым Василием Николаевичем, указала, что 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 феномена 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 Александры Андреевны 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.

Соискатель имеет 16 опубликованных работ по теме диссертации, из них в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации – 9 работ, все они опубликованы в журналах, индексируемых международными системами цитирования Web of Science и/или Scopus. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах. В работах обобщены результаты о механизмах влияния внеклеточных ионов кальция на процесс дезагрегации тромбоцитов и роли фосфолипазы А2 гамма в данном процессе. Общий объем опубликованных работ – 3,12 печатных листов и содержит 75% авторского вклада.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Quantitative dynamics of reversible platelet aggregation: mathematical modelling and experiments / A. Filkova, A. Martyanov, A. Dasgupta, M. Panteleev, A. Sveshnikova // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – ID. 6217.

2. The reversible platelet aggregation is caused by an inhibition of iPLA2-dependent TXA2 synthesis in the presence of extracellular calcium / A. Filkova, Garzon, A.K. Dasgupta, A.N. Sveshnikova // FEBS OPEN BIO. – 2019. – Vol. 9 – P. 133–134.

3. Степанян М.Г., Активация тромбоцитов через рецептор GPVI: вариабельность ответа / М.Г. Степанян, А.А. Филькова, А.К. Гарсон Дасгупта, А.А. Мартьянов, А.Н. Свешникова // Биологические мембраны. – 2020. – Т. 37. – № 6 – P. 442–452.

4. Heterogeneity of Integrin αIIbβ3 Function in Pediatric Immune Thrombocytopenia Revealed by Continuous Flow Cytometry Analysis / A. Martyanov, D. Morozova, M. Sorokina, A. Filkova, D. Fedorova, S. Uzueva, E. Suntsova, G. Novichkova, P. Zharkov, M. Panteleev, and A. Sveshnikova // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21 – ID. 3035.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы из:

федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» от кандидата медицинских наук, доцента кафедры внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики имени академика В.С. Моисеева Александры Сергеевны Писарюк;

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» от доктора физико-математических наук, доцента, профессора кафедры биофизики Физического факультета Леонида Владимировича Яковенко;

федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук от доктора биологических наук, профессора, заведующего лабораторией динамики внутриклеточных мембран Елены Сергеевны Корниловой;

федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный

исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации от кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории биомаркеров отдела молекулярных технологий научно-исследовательского института трансляционной медицины Анастасии Павловны Коваль.

В отзывах отмечается актуальность, новизна и практическая значимость работы по изучению феномена обратимой агрегации тромбоцитов человека и разработка методики диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на его основе. Все отзывы положительные, вопросов и принципиальных замечаний не содержат, в то же время доктор физико-математических наук, доцент Леонид Владимирович Яковенко в своем отзыве в качестве технического замечания указывает на то, что при адекватности статистического анализа результатов в некоторых местах отсутствуют численные данные ошибок измерений, а также на необходимость изложения компьютерной модели оценки агрегации тромбоцитов в виде системы дифференциальных уравнений не только в диссертации, но и а автореферате.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их широко известными достижениями в области исследования крови, в том числе свёртывания крови и функциональности тромбоцитов, их соответствием требованиям Положения о присуждении ученых степеней, а также их согласием. Ведущая организация не имеет договорных отношений с соискателем, оппоненты не имеют с ним совместных проектов и публикаций.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана методика диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на основе феномена обратимой агрегации. Параметры нового протокола теста агрегометрии имеют предсказательную способность о рисках кровотечений пациентов во время операции трансуретральной резекции, а также чувствительны к восстановлению функциональной активности

тромбоцитов пациентов на двойной антитромбоцитарной терапии;

предложено новое объяснение молекулярного механизма возникновения обратимой агрегации: необратимость агрегации тромбоцитов в отсутствие физиологической концентрации ионов кальция в суспензии обеспечивается синтезом тромбоксана. Его синтез инициируется в результате активности фосфолипазы A2γ, вызванной опустошением внутриклеточных депо кальция в тромбоцитах. В присутствии ионов кальция в среде внеклеточные ионы кальция восполняют кальциевые депо, что приводит к прекращению активации фосфолипазы A2γ.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано влияние внеклеточных ионов кальция на кальций-независимую фосфолипазу A2γ: методом проточной цитофлуориметрии показано восполнение кальциевых депо тромбоцита в присутствии внеклеточных ионов кальция, что приводит к прекращению активации фосфолипазы A2γ;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: турбидометрическая агрегометрия, флуоресцентная проточная цитометрия, флуоресцентная конфокальная микроскопия и математическое моделирование в среде COPASI, позволивший проанализировать опустошение кальциевых депо и последующую активацию кальций-независимой фосфолипазы A2 в отсутствие внеклеточных ионов кальция;

изложены основные положения исследования по наполнению кальциевых депо и инактивации фосфолипазы A2 с последующей дезагрегацией тромбоцитов: дезагрегация тромбоцитов наблюдается при активации суспензии не только АДФ, но и комбинацией адреналина и серотонина. При этом снижение концентрации тромбоцитов сокращает время дезагрегации, а при понижении температуры предварительной инкубации повышает время дезагрегации и максимум светопропускания;

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что они внедрены: в клиническую практику для диагностики агрегационной способности тромбоцитов у пациентов с различными заболеваниями;

определены возможности использования методики для выявления группы пациентов с повышенным риском кровопотери во время операции: разработанная методика диагностики агрегационной способности тромбоцитов основана на регистрации изменения светопропускания суспензии тромбоцитов, вызванного АДФ, при физиологической концентрации ионов кальция в среде, при температуре проведения измерений +37 °С и стандартизованной концентрации тромбоцитов;

созданы предпосылки для дальнейшего изучения механизмов агрегации тромбоцитов и разработки новых методов лечения тромбозов и кровотечений;

представлены доказательства эффективности использования параметров агрегации тромбоцитов для оценки эффективности лечения пациентов на двойной антитромбоцитарной терапии: параметры разработанной методики диагностики агрегационной способности тромбоцитов коррелируют с риском кровопотери во время операции трансуретральной резекции простаты, а также обладают чувствительностью к восстановлению функциональной активности тромбоцитов в течение 180 дней у пациентов на двойной антитромбоцитарной терапии;

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

теория построена на известных, проверяемых данных, фактах, согласуется с опубликованными данными по теме диссертации: исследование проф. Смани о механизмах активации кальций-независимой фосфолипазы А2, проф. Йода о роли кальций-независимой фосфолипазы А2 в процессах гемостаза;

были использованы современные методики статистического анализа данных: для оценки агрегационных кривых анализировались следующие параметры: максимум агрегации как максимальное значение

светопропускания в кювете с суспензией тромбоцитов; индекс обратимости – отношение светопропускания суспензии тромбоцитов в кювете агрегометра на 600й секунде к максимальному значению светопропускания агрегационной кривой. Достоверность различия результатов оценивалась непараметрическим статистическим критерием Манна-Уитни. Результаты анализировались программным обеспечением OriginPro v.8.5 (Microcal Software; США) и были представлены в виде среднего, по меньшей мере, 3 повторных измерений ± стандартное отклонение (SD), если не указано другое;

полученные результаты были подтверждены повторными измерениями и контрольными экспериментами;

исследование проводилось с учетом всех этических и правовых норм, регулирующих научную деятельность: исследование одобрено независимым этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России от 23.06.2020;

полученные результаты могут быть использованы в дальнейших исследованиях и практической медицине: разработанная методика диагностики агрегационной способности тромбоцитов основана на регистрации изменения светопропускания суспензии тромбоцитов, вызванного АДФ, при физиологической концентрации ионов кальция в среде, при температуре проведения измерений +37 °С и стандартизованной концентрации тромбоцитов;

Личный вклад автора состоит в том, что автор принимала непосредственное участие в формировании цели и задач исследования, самостоятельно ставила эксперименты. Автор участвовала в формировании базы данных, выполняла анализ данных литературы, статистическую обработку данных и анализ полученных результатов. Все работы по исследованию механизмов обратимой агрегации тромбоцитов методами агрегометрии, цитометрии и конфокальной микроскопии, обработка и анализ результатов экспериментов, проведенных для выявления механизмов феномена, и обработка и анализ результатов клинических тестов, проведенных

пациентам, а также написание статей и тезисов конференций по материалам диссертации проводились либо лично автором, либо при непосредственном участии автора.

В ходе защиты диссертации критических замечаний высказано не было.

Соискатель Филькова А.А. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы.

На заседании 27 июня 2023 года диссертационный совет принял решение за выполнение научной задачи по исследованию феномена обратимой агрегации тромбоцитов и разработке лабораторного метода оценки тромбоцитарного гемостаза на его основе присудить Фильковой Александре Андреевне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 9 докторов наук по научной специальности 1.5.2. Биофизика, 10 докторов наук по научной специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 20 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 19, против – нет.

Председатель
диссертационного совета Масчан Михаил Александрович

Ученый секретарь
диссертационного совета Блинов Дмитрий Сергеевич

28.06.2023 г.