«УТВЕРЖДАЮ»

Директор
ФГБУН ЦТП ФХФ РАН
д.физ.-мат.н., чл.-корр. РАН

_____ М.А. Пантелеев

19 января 2023 г.

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель генерального директора по науке – директор Института гематологии, иммунологии и клеточных технологий ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
д.м.н., профессор, чл.-корр. РАН

_____ А.А. Масчан

19.01. 2023 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук и федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации на диссертационную работу «Исследование феномена обратимой агрегации тромбоцитов человека и разработка методики диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на его основе»

Диссертационное исследование Фильковой Александры Андреевны «Исследование феномена обратимой агрегации тромбоцитов человека и разработка методики диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на его основе» выполнено в лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук и 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.

Филькова Александра Андреевна в 2019 году с отличием окончила магистратуру Физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Москов-

ский государственный университет им. М.В. Ломоносова» по специальности «Физика».

Соискатель Филькова Александра Андреевна в настоящее время работает в должности младший научный сотрудник лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, г. Москва.

В период подготовки диссертации Филькова Александра Андреевна обучалась в аспирантуре при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации с 2019 по 2022 г.

Справка об сдаче кандидатских экзаменов №10-22 выдана федеральным государственным бюджетным учреждением «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации 20.07.2022.

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.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность темы исследования

В настоящее время классическим методом оценки состояния тромбоцитарного гемостаза является световая турбидометрическая агрегометрия – метод наблюдения агрегации тромбоцитов в ответ на добавление индуктора через изменение светопропускания перемешиваемой суспензии тромбоцитов. Традиционно антикоагулянтом для забора крови для теста агрегометрии является цитрат натрия, с высокой афинностью связывающий ионы кальция и предотвращающий образования тромбина в результате активации плазменного звена. Однако, это делает систему нефизиологичной, так как в плазме крови присутствует 1.1-1.5 мМ свободных ионов кальция. Известно, что ионы кальция необходимы для полноценной активации тромбоцитов, поэтому наблюдение процесса агрегации в их отсутствие не соответствует физиологическому состоянию. Кроме того, данный тест до сих пор имеет существенные недостатки, такие как широкая вариабельность результатов и большая чувствительность к преаналитическим процессам. В связи с этим, наблюдение агрегации тромбоцитов при физиологической концентрации ионов кальция может позволить получить более точную информацию о состоянии тромбоцитарного гемостаза. При использовании антикоагулянтов, не связывающих кальций, происходит ослабление образования агрегатов тромбоцитов и наблюдается феномен обратимой агрегации. Изучение феномена обратимой агрегации позволит определить ранее неизвестные механизмы агрегации тромбоцитов, роль ионов кальция в данном процессе, а также даст возможность разработать новый, более чувствительный к определению функциональной активности тромбоцитов, протокол агрегометрии.

Поэтому актуальной задачей является всестороннее исследование феномена обратимой агрегации тромбоцитов. Все это определяет актуальность темы диссертационного исследования, его теоретическую и практическую значимость, а также правильность поставленной цели и задач исследования.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации

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. Автор опубликовала основные результаты исследования в рецензируемых научных изданиях (16), в том числе журналах, включенных в перечень ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации (7).

Степень достоверности результатов исследования

Обоснованность и достоверность полученных результатов обеспечивается согласованием полученных практических результатов с известными фундаментальными постулатами, репрезентативностью выборки включенных в исследование пациентов, применением современных методов статистической обработки данных и выбором адекватных критериев анализа. Достоверность полученных результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых научных изданиях и обсуждением результатов исследования на международных конференциях.

Новизна и практическая значимость исследования

В работе предложен абсолютно новый молекулярный механизм возникновения обратимой агрегации. Результатом исследования стала разработка методики 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. Автором работы было показано:

1) снижение концентрации тромбоцитов в суспензии с 300тыс.кл/мкл до 100тыс.кл/мкл сокращает время дезагрегации тромбоцитов в 2 раза. При понижении температуры преинкубации тромбоцитов с 37 °С до 28 °С время дезагрегации и максимум светопропускания снижаются в 3 раза;

2) необратимость агрегации тромбоцитов в отсутствие физиологической концентрации ионов кальция в суспензии обеспечивается синтезом тромбоксана А2 (6-8 пг/мл в ответ на 5 мкМ АДФ) предположительно инициируемым в результате активности фосфолипазы А2γ, вызванной опустошением внутриклеточных депо кальция в тромбоцитах;

3) разработанная методика диагностики агрегационной способности тромбоцитов основана на регистрации изменения светопропускания суспензии тромбоцитов, вызванного 1-3 мкМ АДФ, при физиологической концентрации ионов кальция в среде;

4) разработанная методика диагностики агрегационной способности тромбоцитов позволяет выделить группу пациентов с повышенным риском кровопотери во время операции трансуретральной резекции по параметру максимальной агрегации тромбоцитов;

5) предложенные параметры агрегации тромбоцитов (максимальная агрегация и индекс обратимости) являются чувствительными параметрами для определения восстановления функциональности тромбоцитов у пациентов на двойной антитромбоцитарной терапии в течение 180 дней.

Ценность научной работы соискателя

Практическим результатом исследования стала разработка протокола теста агрегометрии на основе феномена обратимой агрегации. Новый тест позволяет проводить более чувствительное исследование функциональности тромбоцитов у пациентов с нарушениями гемостаза. По результатам диссертационного исследования рекомендовано проведение оценки функциональности тромбоцитов пациентам перед операцией трансуретральной резекции

для прогнозирования объема кровопотери во время операции, а также пациентам на двойной антитромбоцитарной терапии.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационного исследования опубликовано 16 научных работ, из них 7 – в изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации для публикации основных результатов диссертационных исследований. В работах в достаточном объеме отражены результаты проведенного исследования, обсуждаемые на Всероссийских, межрегиональных научно-практических конференциях и симпозиумах.

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации России:

1. Development of a Simple Kinetic Mathematical Model of Aggregation of Particles or Clustering of Receptors / A. K. Garzon Dasgupta, A. A. Martyanov, A. A. Filkova [et al.] // Life. – 2020. – Vol. 10. – № 6.

2. Heterogeneity of Integrin αIIbβ3 Function in Pediatric Immune Thrombocytopenia Revealed by Continuous Flow Cytometry Analysis / A. Martyanov, D. Morozova, M. Sorokina [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – ID 3035.

3. Platelet Activation through GPVI Receptor: Variability of the Response / M. G. Stepanyan, A. A. Filkova, A. K. Garzon Dasgupta [et al.] // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2021. – Vol. 15. – № 1. – P. 73-81.

4. Quantitative dynamics of reversible platelet aggregation: mathematical modelling and experiments / A. A. Filkova, A. A. Martyanov, A. K. Garzon Dasgupta [et al.] // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 6217.

5. Vasilev G. A. Study of Reversible Platelet Aggregation Model by Nonlinear Dynamics / G. A. Vasilev, A. A. Filkova, A. N. Sveshnikova // Mathematics. – 2021. – Vol. 9. – № 7.

6. Филькова А.А., Пантелеев М.А. С. А. Н. Обратимая агрегация тромбоцитов в присутствии ионов кальция: механизмы и потенциальная

значимость / С. А. Н. Филькова А.А., Пантелеев М.А. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2019. – Т. 18. – № 3. – С. 120-129.

7. Effects of bacterial lipopolysaccharides on platelet function: inhibition of weak platelet activation. / A. A. Martyanov, A. S. Maiorov, A. A. Filkova [et al.] // Scientific reports. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – ID 12296.

Специальности, которым соответствует диссертация

Диссертационное исследование соответствует Паспорту специальности 1.5.2. Биофизика, а именно: п.1. Теоретическое и экспериментальное изучение принципов строения и физико-химических механизмов функционирования живых систем на всех уровнях их организации – от молекулярного и клеточного до биосферного. 1) Общая биофизика: биофизика регуляторных процессов; п. 3. Разработка математических моделей биологических объектов как сложных нелинейных физических систем. Исследование явлений пространственно-временной самоорганизации, саморегуляции и самоуправления в биологических системах, включая методы неравновесной термодинамики и синергетики; Паспорту специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, а именно: п.1. Основы теории клинической лабораторной диагностики Определение качественных и количественных характеристик морфологических, химических и других параметров биологических материалов.

Диссертация Фильковой Александры Андреевны «Исследование феномена обратимой агрегации тромбоцитов человека и разработка методики диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на его основе» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.2. Биофизика, 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Заключение принято на совместном расширенном межучрежденческом заседании лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской ака-

демии наук и лабораторий клеточной биологии и трансляционной медицины; биофизики; клинико-диагностической лаборатории федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Присутствовало на заседании 22 человека, в т. ч. докторов наук по рассматриваемым специальностям – 10 человек.

Результаты голосования: «за» 22 чел., «против» нет, «воздержались» нет, протокол № 1 от «19» января 2023 г.

Председатель заседания
заведующий лабораторией биофизики
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
доктор биологических наук Елена Ивановна Синауридзе

Подпись Е.И.Синауридзе заверяю
Учёный секретарь ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им.Дмитрия Рогачева» Минздрава России, д.м.н., профессор Елена Александровна Спиридонова