

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Литвиненко Алены Леонидовны «Количественное описание популяции тромбоцитов в нативном состоянии и под воздействием агониста активации» по специальности 1.5.2. Биофизика на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук

Актуальность темы исследования

Исследование морфологии и функциональной активности тромбоцитов не теряет своей актуальности многие годы. Это связано в первую очередь с лидирующей позицией среди основных причин смертности и инвалидизации сердечно-сосудистых заболеваний, в патогенезе которых система гемостаза и ее тромбоцитарное звено играют ключевую роль. С другой стороны, тромбоциты, как объект исследования и диагностики, представляют собой сложную для анализа систему. Несмотря на существование многочисленных способов оценки состояния тромбоцитов, идеального метода не существует, все подходы имеют свои «слабые» места, а именно – необходимость проводить исследование в течении короткого времени после изъятия клеток из сосудистого русла, потеря нативных свойств при хранении и фиксации тромбоцитов, быстрая активация под действием различных факторов (способ венепункции, время хранения, режим центрифугирования и т.п.), в результате чего данные полученные о состоянии тромбоцитов в экспериментах *in vitro* не всегда отражают их состояние *in vivo*, что может сказываться на правильной интерпретации результатов диагностических исследований и влиять на принятие правильных клинических решений.

В настоящее время тромбоциты рассматриваются как самые маленькие, безъядерные клетки крови, которые выполняют широкий спектр функций, начиная от реализации гемостатических реакций, а также участия в провоспалительном и иммунном ответе, регуляции состояния эндотелия, пролиферации сосудов, заживлении ран, регенерации тканей и метастазирования опухолей. На подавление активации и агрегации тромбоцитов направлено действие антиагрегантных препаратов, таких как препараты ацетилсалициловой кислоты, блокаторы АДФ-рецепторов, селективные блокаторы рецепторов для фибриногена, новые терапевтические агенты – блокаторы рецепторов тромбина. Первые два класса антиагрегантов широко используются на этапе длительного амбулаторного лечения пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями для первичной и вторичной профилактики тромботических эпизодов в артериальном русле.

Таким образом, существует необходимость как в разработке новых подходов и инструментов для оценки активации и агрегации тромбоцитов, определения их остаточной реактивности на фоне лекарственной терапии, так и в создании моделей, характеризующих морфологические особенности клеток и способных

прогнозировать поведение популяции тромбоцитов под воздействием различных факторов. В этой связи актуальность диссертационного исследования Литвиненко Алены Леонидовны «Количественное описание популяции тромбоцитов в нативном состоянии и под воздействием агониста активации», ставящего своей целью разработку математического описания распределения тромбоцитов по форме в нативном состоянии, и эволюции этого распределения под воздействием агониста активации, не вызывает сомнений.

**Степень новизны, обоснованности научных положений и выводов,
сформулированных в диссертации, апробация результатов**

В диссертационной работе Литвиненко А.Л. впервые предложен метод математического описания гетерогенной по форме популяции тромбоцитов, причем показана гетерогенность не только для активированных клеток, но и для нативных тромбоцитов. Выявлено три субпопуляции, отличающиеся по параметрам формы – неактивированные, частично активированные, полностью активированные тромбоциты. Построена модель активации тромбоцитов, учитывающая параметры чувствительности к агонисту активации, которая объясняет наличие популяции частично активированных клеток, наблюдаемой как в нативных пробах, так и после добавления агониста. Соответственно, в работе представлены новые данные о механизмах активации тромбоцитов и математическом моделировании ответа клеток на внешние воздействия.

Диссертационное исследование Литвиненко А.Л. выполнено на высоком методическом уровне, с использованием современных методик и оборудования при проведении экспериментов с нативными и активированными тромбоцитами, адекватно отвечающих требованиям для выполнения поставленных в работе задач. Автор диссертационной работы соблюденены все правила научных исследований и принципы биоэтики. Применяемые методы математической обработки результатов и статистического анализа также полностью соответствуют поставленной цели и сформулированным задачам. Все вышеперечисленное позволяет сделать заключение о достоверности полученных данных. Выводы, сделанные на основании результатов исследования обоснованы, и соответствуют задачам исследования. Положения, выносимые на защиту, сформулированы четко, отражают суть полученных в ходе выполнения диссертационного исследования результатов.

По теме диссертации опубликована 21 печатная работа, из них 6 в рецензируемых научных журналах системы WoS, приравненных к публикациям в журналах из перечня ВАК России для опубликования основных результатов диссертационных исследований, и 14 публикаций в материалах отечественных и зарубежных научных конференций. Соответственно результаты диссертационного исследования и основные положения работы были неоднократно представлены и обсуждались на таких ведущих научных форумах по тематике исследования, как 30-

м конгрессе международного общества улучшения цитометрии в Глазго, Великобритания (2015 г.), на Международном конгрессе общества тромбозов и гемостаза 2017 в Берлине, Германия (2017 г.), на 33-ем конгрессе международного общества улучшения цитометрии в Праге, Чехия (2018 г.), на Международном конгрессе общества тромбозов и гемостаза 2019 в Мельбурне, Австралия (2019 г.). Публикации полностью отражают основные результаты диссертационного исследования.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая и практическая значимость работы не вызывает сомнений. Фундаментальным результатом диссертационного исследования безусловно является математическое описание субпопуляций нативных тромбоцитов и построение математической модели, описывающей изменение формы тромбоцита в процессе активации.

Практическую значимость имеет определение параметров чувствительности тромбоцитов к агонисту, в том числе на фоне антиагрегантной терапии, а также разработка протокола подготовки и измерения тромбоцитов на сканирующем проточном цитометре с учетом влияния на результат преаналитических манипуляций.

Полученные результаты могут стать основой как для дальнейших теоретических разработок моделей активации тромбоцитов, так и для практических рекомендаций по оценке остаточной реактивности тромбоцитов на фоне антиагрегантной терапии и оптимизации преаналитического этапа исследований тромбоцитарной функции.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертация Литвиненко Алены Леонидовны является завершенной работой, построенной в целом по традиционному плану, изложенной литературным языком на 119 страницах машинописного текста, иллюстрирована 11 таблицами и 24 рисунками, состоит из введения и 6 глав, включающих обзора литературы, главы с описанием методов исследования и изложением результатов собственных исследований, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, который включает в себя 97 отечественных и зарубежных источников.

После введения, в котором отражены данные об актуальности темы, определены цель и задачи исследования, представлен обзор литературы, где автор анализирует уже опубликованные данные для формирования собственной оценки существующей проблемы. В обзоре литературы подробно описаны физиология тромбоцитов, современная модель гемостаза, форма тромбоцитов и факторы, ее определяющие, реакция тромбоцитов на различные физические и химические воздействия, существующие антиагрегантные лекарственные препараты и методы исследования тромбоцитов и их функциональной активности. Кроме того, описаны

некоторые математические подходы к описанию объектов, сходных с тромбоцитами, на основе экспериментальных данных. Обзор литературы аргументирует необходимость проведения диссертационной работы и связан с материалом, представленным в главах собственных исследований.

Результаты собственных исследований приведены в главах 2-6. При чем глава 2 подробно описывает измерение формы тромбоцитов с использованием технологии сканирующей проточной цитометрии, включая протоколы пробоподготовки, математическое обоснование необходимости модернизации технологии сканирующей проточной цитометрии и саму процедуру модернизации, которая заключалась в изменении системы подачи пробы для уменьшения скорости сдвига и предотвращения активации клеток под воздействием сдвигового напряжения. Главы 3 и 4 посвящены оптическим моделям нативного тромбоцита и возможным функциям распределения тромбоцитов в зависимости от формы, соответственно. Глава 5 содержит математическое описание популяции тромбоцитов без воздействия стимулов активации и после активации АДФ определенной концентрации. Построенная феноменологическая модель реакции популяции тромбоцитов на АДФ, включает параметры, характеризующие исходное состояние клеток, чувствительность к агонисту и зависимость, описывающую переход нативных тромбоцитов в активированное состояние. Теоретические распределения изменения индекса формы тромбоцитов, полученные с помощью линейной зависимости, оказались максимально соответствующими экспериментальным данным и объясняли наличие популяции частично активированных клеток.

Модели, полученные на основании теоретических расчетов в главах 3,4 и 5, были верифицированы в ходе экспериментов, описания которых приведены в главе 6. Экспериментальные исследования включают измерение светорассеяния при анализе тромбоцитов на сканирующем проточном цитометре на двух длинах волн, выбор соответствующей оптической модели для описания формы клеток, определение фракций нативных тромбоцитов условно здоровых доноров, определение значений чувствительности популяции тромбоцитов условно здоровых доноров к агонисту активации, анализ влияния антиагрегантной терапии на чувствительность популяции тромбоцитов к агонисту активации. Основными выводами из экспериментальных результатов 6 главы можно назвать следующие: для описания популяции тромбоцитов целесообразно использовать модель «сплюснутый сфероид», а для исследования светорассеяния на сканирующем проточном цитометре использовать длину волны 0.66 мкм, полученные экспериментальные популяции тромбоцитов соответствуют теоретической функции распределения, гетерогенны по составу и включают три субпопуляции, которые охарактеризованы значениями моды индекса формы тромбоцитов. Следует отметить, что данный параметр, предложенный автором для оценки формы

нативных, активированных и частично активированных тромбоцитов имеет дисперсию, сопоставимую с дисперсией для параметра «распределение тромбоцитов по объему», который выдает гематологический анализатор при выполнении общего анализа крови. Еще одним важным выводом из результатов экспериментальных исследований является подтверждение адекватности использования параметра феноменологической модели, описывающего чувствительность к агонисту активации АДФ, для оценки эффективности селективного блокатора АДФ-рецепторов клопидогрела.

Следует отметить, что автор приводит обсуждение результатов в конце каждой главы, с одной стороны подводя итог части своего исследования, с другой – логично переходя к следующему разделу теоретических или экспериментальных исследований.

В разделе «Заключение» еще раз подводятся итоги всей диссертационной работы и коротко обобщаются основные полученные результаты, которые, по сути, сформулированы как выводы исследования.

Автореферат диссертационной работы Литвиненко А.Л. полноценно отражает содержание диссертационной работы.

Соответствие специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.2. Биофизика, а именно направлению исследования – разработка математических моделей биологических объектов как сложных нелинейных физических систем.

Замечания по диссертационной работе

В целом диссертационная работа Литвиненко Алены Леонидовны «Количественное описание популяции тромбоцитов в нативном состоянии и под воздействием агониста активации» производит впечатление законченной и хорошо продуманной работы. Однако есть несколько замечаний:

- 1) Метод Борна – это золотой стандарт именно для исследования индуцированной агрегации тромбоцитов, а не гемостаза в целом, как отмечает автор во введении. Причем далее по тексту и в соответствующем разделе, описывающем метод подробно, назначение данного метода интерпретируется уже правильно.
- 2) Индуцированная агрегация тромбоцитов, измеренная оптическим методом по Борну или методом импедансной агрегатометрии, мало зависит от процесса коагуляции, так как дополнительно тканевой фактор не добавляется, а того, который выделился при венепункции и попал в исследуемую плазму, недостаточно для запуска реакций образования фибринового сгустка.
- 3) В обзоре литературы в разделе 1.2 – Современная модель ответа системы гемостаза на повреждение сосуда большее внимание уделено описанию реакций плазменного гемостаза – активация факторов свертывания под действием тканевого фактора, формирование на поверхности активированных тромбоцитов

протромбиназного и теназного комплексов, лавинообразное образование тромбина и формирование фибринового сгустка, т.е. стабильного тромба. Однако такой механизм характерен для тромбообразования в венозном русле. Значимость же тромбоцитов для тромбообразования более наглядно демонстрируется в артериальном кровотоке, где адгезия, агрегация и формирование «белого» тромбоцитарного тромба первично, а активация плазменных факторов и фибринообразование идет следующим этапом, армируя белый тромб нитями фибрина. С учетом последующего обсуждения антиагрегантной терапии, которая применяется как раз при артериальных тромбозах, то есть при сердечно-сосудистых заболеваниях - инфаркте миокарда, остром коронарном синдроме, ишемическом инсульте, такая подача информации о физиологии и функциях тромбоцитов представлялась бы более наглядной и предпочтительной.

4) Автором допускаются некоторые неточности в терминологии: тромбин – фактор свертывания, а не свертываемости; фактор свертывания II – это протромбин, а не тромбин, который является фактором свертывания IIa – активным; антитромботическая терапия – обобщенное название, которое включает антикоагулянтную терапию – препараты действуют на плазменные факторы свертывания, и антиагрегантную терапию – препараты блокируют активацию тромбоцитов и снижают их способность к агрегации; термины «антитромбоцитарная терапия» и «антиагрегантная терапия» – синонимы; гликопротеин GPIIb/IIIa отвечает за агрегацию тромбоцитов посредством соединения с молекулой фибриногена, но не за адгезию тромбоцитов; дипиридамо́л и цилостазол (у автора опечатка «циластозол»), строго говоря, не относятся к антиагрегантным препаратам, но действительно могут подавлять функциональную активность тромбоцитов.

5) Анализировать эффект препаратов ацетилсалициловой кислоты на основании уменьшения чувствительности тромбоцитов к АДФ не вполне корректно, для этих целей в клинической практике используется арахидоновая кислота в качестве агониста, также может быть использован коллаген. Таким образом автор получил вполне ожидаемый «необъяснимый результат» - увеличение параметров, которые характеризуют чувствительность к АДФ, на фоне приема донором препарата ацетилсалициловой кислоты.

Данные замечания не существенны для понимания сути работы и интерпретации полученных результатов, однако автору рекомендуется учесть их при последующих исследованиях.

Принципиальных замечаний к содержанию диссертационной работы у оппонента нет. Однако, в порядке дискуссии хотелось бы получить ответы на следующие вопросы:

1) В экспериментальной части проведено исследование условно здоровых доноров. Диссертант выносит на защиту положения, сделанные на основании исследования образцов 20 и 9 доноров, соответственно. Является ли такое количество исследованных образцов достаточным с точки зрения достоверной статистической обработки результатов эксперимента?

2) Ответ тромбоцитов на индукцию АДФ может зависеть от генетических вариантов как АДФ-рецептора P2Y₁₂ (H1/H2 гаплотип), так и рецептора для фибриногена GPIIb/IIIa (нуклеотидная замена, приводящая к замене Leu33Pro), частота указанных неблагоприятных генетических вариантов у условно здоровых доноров составляет около 10%, а у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями 15%-20%, а сами они ассоциируются с гиперагрегацией тромбоцитов, согласно многочисленным отечественным и зарубежным публикациям. Учитывал ли диссертант указанные генетические варианты при формировании критериев включения-исключения в исследуемую группу доноров? Планируется ли продолжение работы с моделью перехода тромбоцита из нативного в активированное состояние с учетом наличия/отсутствия данных генетических вариантов? Как, по мнению диссертанта, на описанные в работе параметры, характеризующие чувствительность тромбоцитов к используемому агонисту АДФ и ответ тромбоцитов на антиагрегантную терапию клопидогрелом, будут влиять указанные генетические варианты?

3) В разделе 6.3 диссертант обсуждает разброс параметра АДФ_{eff} между разными донорами, который варьируется почти в 10 раз, и предполагает связь такого разброса с влиянием на преаналитическом этапе, а именно с забором крови, который по мнению диссертанта трудно стандартизировать. Однако следует отметить, что преаналитический этап при исследовании тромбоцитов в клиничко-диагностических лабораториях стандартизирован – забор крови осуществляется в вакутейнеры с цитратом натрия, транспортируется, центрифугируется и исследуется в течении не более 2 часов. Кроме того, диссертант подробно описывает протокол забора крови у доноров, в том числе модифицированный «мягкий» протокол, который минимизирует преждевременную активацию клеток. Вопрос, с чем еще, по мнению диссертанта, может быть связан такой разброс? Оценивались ли какие-то индивидуальные особенности доноров, которые могут влиять на функциональную активность нативных тромбоцитов - ИМТ, липидный спектр, курение?

Заданные оппонентом вопросы не умаляют значимости полученных результатов, сделанных выводов и вынесенных на защиту положений в целом, а лишь отражают важность решаемой диссертантом задачи и научный интерес к проблеме.

Заключение

Таким образом, диссертация Литвиненко Алены Леонидовны «Количественное описание популяции тромбоцитов в нативном состоянии и под воздействием агониста активации» по специальности 1.5.2. Биофизика на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной задачи по созданию математической модели активации тромбоцитов и определения параметров чувствительности к агонистам на фоне антиагрегантной терапии, имеющей значение для развития персонализированного подхода к лечению и профилактике социально-значимых сердечно-сосудистых заболеваний, и **соответствует требованиям пунктов 9-11, 13, 14** «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Официальный оппонент:

Сироткина Ольга Васильевна

доктор биологических наук (14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика, 03.02.07 – генетика),

доцент, декан факультета биомедицинских наук, профессор кафедры лабораторной медицины с клиникой института медицинского образования

федерального государственного бюджетного учреждения

«Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

Телефон: +7 [redacted] 67

e-mail: S [redacted] centre.ru

[redacted] /Сироткина О.В./

Дата «28» 12 2023 г.

Подпись Сироткиной Ольги Васильевны заверяю

Ученый секретарь

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России



доктор медицинских наук, профессор

Недошивин Александр Олегович