



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

**Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук
(ИЭФБ РАН)**

пр. Тореза, д. 44, г. Санкт-Петербург, 194223
тел.: 552-79-01, факс: 552-30-12
e-mail: office@iephb.ru, http://www.iephb.ru
ОКПО 02698559, ОГРН 1027801535728
ИНН/КПП 7802038273/780201001

20.12.2023 № 1 / 884

На №



ОТЗЫВ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института эволюционной физиологии и биохимии им. Сеченова» Российской академии наук на диссертационную работу Литвиненко Алёны 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

Внутрисосудистое тромбообразование с участием тромбоцитов в значительной степени является причиной ряда сердечно-сосудистых патологических нарушений, поэтому актуальность диссертации, направленной на исследование популяции тромбоцитов в нативном и активированном состоянии не вызывает сомнения. Работа направлена на количественное изучение субпопуляций тромбоцитов как в нативном состоянии, так и под воздействием стимула, что является актуальной задачей установления механизмов нарушения клеточного гемостаза. Несмотря на использование ряда новых методов для диагностики тромбоцитарного звена гемостаза задача разработки оперативных методов оценки функционального статуса тромбоцитов является актуальной клинической задачей.

Связь работы с планами медицинской области науки

Основной темой работы является исследование состояния тромбоцитов. Эти форменные элементы крови изменяют своё состояние в процессе развития нескольких групп патологий, причём не только в процессе развития патологий сердечно-сосудистой системы. Активно применяются препараты, оказывающие влияние именно на тромбоциты. Тем не менее, на сегодняшний день в медицинской практике не распространены подходы исследования функционирования тромбоцитов в отсутствие остальных участников системы гемостаза. В работе представлены подходы, направленные на решение этой задачи потенциально способные улучшить качество диагностики тромбоцитарного звена гемостаза и тем самым персонализировать применения антитромбоцитарной терапии.

Новизна работы

Работа является развитием инновационного метода сканирующей проточной цитометрии, который позволяет на основе сигналов светорассеяния в угловом диапазоне 10° – 70° (индикатриса светорассеяния), при решении обратной задачи светорассеяния определить геометрические параметры клеток. Для тромбоцитов решение этой обратной задачи позволило определить объём и форму (индекс формы) в приближении сплюснутого сфероида. В работе впервые построено и математически описано распределение нативных тромбоцитов и тромбоцитов по индексу формы. Данный новый подход позволил обобщить особенности функционирования одиночных клеток на всю популяцию, выделить три субпопуляции тромбоцитов в образцах крови и сравнить распределение тромбоцитов различных доноров на количественном уровне.

Значимость работы для науки и производства

Для получения сигналов светорассеяния в расширенном угловом диапазоне, в работе использована технология сканирующей проточной цитометрии. Ранее была показана эффективность этого подхода для работы с эритроцитами, лимфоцитами и хиломикронами. Тромбоциты являются частицами с высокой чувствительностью к изменению сдвигового напряжения. В работе описываются требования, предъявляемые к режиму работы гидродинамической системы сканирующего проточного цитометра, позволяющие минимизировать воздействие этой системы на тромбоциты, что является значимым для дальнейшей разработки конструкции сканирующих проточных цитометров.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.

В работе используются современные методы и подходы к исследованию формы одиночных объектов. За счёт быстрой скорости измерения частиц, удаётся добиться высокой статистической точности для каждой измеренной пробы, что позволяет построить достоверные распределение по форме. Данные, представленные в работе, воспроизводимы, что доказывается измерением тромбоцитов для нескольких условно-здоровых доноров. Выводы, представленные в работе, согласуются с экспериментальными наблюдениями, что говорит о их обоснованности.

Содержание работы

Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, списка условных обозначений и списка литературы. Текст работы изложен на 119 страницах, включает в себя 24 рисунка и 11 таблиц. Список литературы включает 97 источников.

Во **введении** кратко описана актуальность работы, поставлена цели и задачи исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту и показаны теоретическая и практическая значимости работы.

Первая глава направлена на описание существующей информации о тромбоцитах в литературных источниках. В главе рассказано о физиологии тромбоцита. Уделяется внимание основным структурным элементам, таким как периферическое кольцо микротрубочек и мембраны, отвечающим за поддержание формы. Описаны основные механизмы изменения формы тромбоцита под воздействием внешних факторов, как химических, так и физических. Отдельно делается акцент на общий этап, предшествующий изменению формы тромбоцита, вне зависимости от

фактора воздействия, запускающего изменение формы. В завершении главы представлен раздел, посвящённый препаратам, используемым в качестве антитромбоцитарной терапии и описаны современные методы исследования тромбоцитов.

Вторая глава посвящена описанию технологии сканирующей проточной цитометрии. В рамках главы показаны результаты тестирования существующей системы подачи пробы, описано её воздействие на тромбоциты и предложена модификация этой системы для уменьшения этого воздействия. Дополнительно приведён распространённый протокол подготовки пробы тромбоцитов и предложена модификация для уменьшения влияния преаналитических факторов.

В **третьей главе** описываются несколько вариантов оптических моделей тромбоцитов и оценивается влияние приближения сложных моделей более простотой. Выбор оптической модели необходим для определения параметров формы тромбоцита по сигналу светорассеяния, получаемому сканирующим проточным цитометром. Также, в рамках главы, автор обосновывает выбор длины волны освещения, используемого для получения сигналов светорассеяния.

Четвёртая глава посвящена математическому описанию функции распределения тромбоцитов в нативном состоянии. Для этого были выбраны три функции-кандидата и описаны их основные свойства. В качестве итоговой функции распределения, автор выбирает сумму трёх бета распределений и в дальнейшем параметры этого суммарного распределения, определённые по экспериментальному распределению, называет параметрами фракционного состава.

В **пятой главе** построена феноменологическая модель поведения популяции тромбоцитов под воздействием агониста активации. Модель основана на особенностях активации одиночного тромбоцита с последующим обобщением на популяцию. Автор вводит основные параметры, важные для наблюдения за изменением формы одиночного тромбоцита с обоснованием их важности, после этого переходит к распределениям по этим параметрам. В продолжение главы предлагаются две зависимости изменения формы тромбоцита, и в завершении главы выбирается зависимость, близкая к экспериментальным наблюдениям.

Шестая глава полностью состоит из экспериментальных подтверждений результатов и выводов, полученных в предыдущих главах. В рамках главы показывается воспроизводимость результатов, рассчитываются средние значения для параметров фракционного состава нативной пробы тромбоцитов и теоретически оценивается применимость этих параметров в качестве диагностических. Определяется чувствительность популяции тромбоцитов к агонисту активации, для различных доноров. В завершении главы приведены результаты исследования, показывающие изменение чувствительности тромбоцитов в условии применения антитромбоцитарной терапии.

Завершают работу «**Заключение**», «**Список условных обозначений**» и «**Список литературы**». В заключении отдельно выделены основные результаты работы.

Соответствие автореферата основным положениям работы

Автореферат соответствует основным идеям и выводам диссертации. В автореферате изложены все основные положения диссертации. \

Публикация основных результатов работы.

Результаты исследования представлены на нескольких профильных международных конференциях и прошли рецензирование в международных научных журналах. Основные результаты работы изложены в 21 научной публикации: из них 6 статей опубликованы в международных научных журналах, рецензируемых WoS, одна статья представлена в Российском журнале, рецензируемом системой РИНЦ и 14 публикаций представлены в материалах отечественных и зарубежных научных конференциях.

Замечания / вопросы:

1. В обзоре (стр.22) и при обсуждении (стр.73) чувствительность агониста связывают с числом рецепторов на клетку, что является неверным тезисом. Чувствительность (как диапазон действующей концентрации) коррелирует с K_d - константой диссоциации комплекса рецептор-лиганд и практически не зависит от плотности рецепторов на мембране клетки. Безусловно, возможна как полная реакция при 10% связывания лиганда (агониста), так и ее отсутствие при 90% насыщении рецептора, но это в большей степени зависит от трансдукции сигнала со сложным балансом активирующих и ингибирующих реакций, а не от плотности рецепторов.
2. В работе выделены три субпопуляции с различной формой клеток, обозначенные как неактивированные, частично активированные и полностью активированные тромбоциты (3 вывод). Такое выделение трех субпопуляций предполагает двухступенчатую реакцию трансформации клеток. Какие реакции трансформации тромбоцитов могут привести к такому разделению на субпопуляции?
3. Делалась ли попытки охарактеризовать найденные субпопуляции, другими маркерными признаками помимо индекса формы? Например, субпопуляция тромбоцитов с псевдоподиями характеризуются активированными интегринами $\alpha IIb\beta 3$ (гликопротеины $IIb/IIIa$), которые методом проточной цитометрии могут быть выделены (гейтированы) по связыванию с антителами PAC-1 или по флуоресцентно меченному фибриногену.
4. При моделировании процесса изменения индекса формы (Рисунки 17, 18) задается концентрация АДФ в диапазоне от 2нМ до 50 нМ. Не очень понятно, на каком основании отдано предпочтение первой модели (зависимость 22), чем второй (зависимость 23)? То, что в экспериментальных условиях обнаруживается три популяции, а во второй модели только две не является критерием выбора. Наоборот, при такой низкой концентрации АДФ (<50 нМ) более вероятно образование «частично активированных» тромбоцитов.
5. К сожалению, на Рисунке 19 и Рисунке 24 указана концентрация АДФ без размерности, что не позволяет оценить степень воздействия индуктора. При представлении экспериментальных данных (Рисунок 24) необходимо указывать не только концентрацию АДФ, но и условия активации тромбоцитов (температура, условия перемешивания, время после воздействия).

Вопросы/замечания носят дискуссионный характер и не влияют на общее положительное впечатление о диссертации.

Заключение

Таким образом, диссертация Литвиненко Алёны Леонидовны представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задачи, определения субпопуляционного распределения тромбоцитов методом сканирующей проточной цитометрии, имеющей существенное значение для разработки оперативного метода клинической диагностики оценки тромбоцитарного звена гемостаза. Работа 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 учёной степени.

Отзыв составлен заведующим лабораторией «Клеточных механизмов гомеостаза крови» ИЭФБ РАН, главным научным сотрудником, доктором биологических наук (03.03.01 – физиология) Миндукшевым Игорем Викторовичем.

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории «Клеточные механизмы гомеостаза крови» 18.12.2023, протокол №1/12

Заведующий лабораторией «Клеточные механизмы гомеостаза крови» ИЭФБ РАН
доктор биологических наук _____ Миндукшев И.В.

Подпись г.н.с., д.б.н. И.В. Миндукшева заверяю:

Ученый секретарь ИЭФБ РАН. _____ Гальперина Е.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН)

Адрес: 194223, Санкт-Петербург, пр.Тореза, д.44

тел. (812) 5527901

e-mail: office@iephb.ru

20 декабря 2023 г.