

УТВЕРЖДАЮ

и.о. директора Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Института
химической кинетики и горения им.

В.В. Воеводского Сибирского
отделения Российской академии наук,
кандидат химических наук

С.В. Валиулин



«20» июня 2023 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского
Сибирского отделения Российской академии наук

о диссертации Литвиненко Алёны Леонидовны *«Количественное описание популяции тромбоцитов в нативном состоянии и под воздействием агониста активации»*, представляемой на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Диссертация *«Количественное описание популяции тромбоцитов в нативном состоянии и под воздействием агониста активации»* выполнена в лаборатории цитометрии и биокинетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКТ СО РАН). В период подготовки диссертации соискатель Литвиненко А.Л. работала в лаборатории цитометрии и биокинетики в должности младшего научного сотрудника и обучалась в аспирантуре в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ).

В 2021 году Литвиненко А.Л. окончила аспирантуру НГУ по направлению 03.06.01. Физика и астрономия. Справка о сдаче кандидатских экзаменов по английскому языку, истории и философии науки и биофизике выдана в НГУ в 2021 году.

Научный руководитель – доктор физико-математических наук, профессор Мальцев Валерий Павлович, основное место работы: ИХКГ СО РАН, должность: заведующий лаборатории цитометрии и биокинетики.

На заседании присутствовали: Молин Ю.Н., д-р. хим. наук, академик; Бакланов А.В., д-р. хим. наук; Боровков В.И., д-р. физ.-мат. наук; Мальцев В.П., д-р. физ.-мат. наук; Глебов Е.М., д-р. физ.-мат. наук; Поляков Н.Э., д-р. хим. наук; Валиулин С.В., канд. хим. наук; Самойлова Р.И., канд. хим. наук; Поздняков И.П., канд. хим. наук; Валиулин С.В., канд. хим. наук; Чернышев А.В., канд. физ.-мат. наук; Некрасов В.М., канд. физ.-мат. наук; Гилёв К.В., канд. физ.-мат. наук; Ястребова Е.С., канд. физ.-мат. наук; Тимошников В.А.

Были заданы следующие вопросы:

Как именно выделялись тромбоциты из цельной крови? Можно ли для тромбоцита выбрать оптическую модель «сфера» или «диск»? Сколько приходится молекул аденозиндифосфата на один тромбоцит? Какое количество условно здоровых доноров необходимо измерить для определения референсных интервалов? Какие критерии для включения/исключения в группу условно здоровых доноров?

На все вопросы соискатель дал исчерпывающие ответы.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность исследования.

Среди 10 основных причин смертности людей, по данным Всемирной организации здравоохранения, лидирующую позицию занимают сердечно-сосудистые заболевания, такие как ишемическая болезнь сердца и инсульт. Контроль развития этих заболеваний включает в себя не только диагностику органов сердечно-сосудистой системы, но и постоянный мониторинг состояния крови.

Кровь – это жидкая ткань организма, состоящая из форменных элементов (40-45%) – эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и плазмы (жидкая часть крови, 55 – 60%). Каждый из форменных элементов отвечает в основном за одну определённую функцию. Для эритроцитов это перенос кислорода от органов дыхания к остальным клеткам, тканям и органам организма. Для тромбоцитов это участие в поддержании гемостаза, то есть балансе кровяной среды между нахождением в жидком состоянии и быстрым переходом в состояние, позволяющее закупорить повреждённый сосуд. Для лейкоцитов это, в основном, функция защиты организма от инородных объектов и удаление повреждённых тканей.

Нарушения в работе сердечно-сосудистой системы отражаются на изменении в функционировании всех трёх типов форменных элементов, однако самым опасным оказывается влияние на систему гемостаза, так как нарушение в работе этой системы может приводить к спонтанному образованию тромбов, а

те, в свою очередь, к закупорке сосудов и, как следствие, к нарушению локального газообмена и развитию воспаления.

С морфологической точки зрения, тромбоциты представляют собой двояковыпуклые безъядерные пластинки 2-4 мкм в диаметре, происходящие от клеток предшественников – мегакариоцитов и свободно циркулирующие в кровотоке.

В момент разрыва сосуда, под воздействием появляющихся в кровотоке веществ (тканевого фактора, коллагена, аденозиндифосфата и др.) и изменением гидродинамического состояния потока крови, тромбоциты переходят в активированное состояние, которое характеризуется изменением формы, появлением специфических рецепторов и выпуском гранул, находящихся в цитоплазме тромбоцитов. В активированном состоянии эти форменные элементы способны адгезировать к стенкам сосудов и агрегировать между собой, что обеспечивает образование первичного белого тромба. На поверхности активированных тромбоцитов запускается каскад коагуляции плазмы, включающий в себя лавинообразное образование тромбина, одного из основных элементов, необходимых для формирования вторичного красного тромба и стабильной закупорки повреждения сосуда. Именно поэтому очень важно следить за нормальным функционированием этих форменных элементов крови в случае развития заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Цель работы – разработка математического описания распределения тромбоцитов по форме в нативном состоянии и эволюции этого распределения под воздействием агониста активации.

Научная новизна. В работе представлены результаты измерений распределений тромбоцитов по параметру формы, как для нативных проб, так и для проб после добавления определённой концентрации агониста активации. Параметр формы показывает степень сплюснутости тромбоцита, что коррелирует с состоянием активации тромбоцита. В измеренных распределениях удалось впервые показать разделение всей популяции тромбоцитов на субпопуляции по параметру формы, как в нативном состоянии, так и после воздействия агониста активации. Изменение в субпопуляциях после добавления определённой концентрации агониста активации позволило определить чувствительность тромбоцитов к воздействию и её изменение при применении антитромбоцитарной терапии.

Теоретическая значимость заключается в математическом описании субпопуляций тромбоцитов по параметру формы внутри нативной пробы, а также в построении модели изменения параметра формы одиночного тромбоцита в процессе активации. На основе построенной модели математически описана активация популяции тромбоцитов при добавлении определённой концентрации агониста активации. Благодаря построенной

модели объяснён феномен появления промежуточного состояния тромбоцитов (между активированными и неактивированными состояниями в терминах изменения формы), показанный экспериментально как для нативных проб, так и для проб после воздействия определённой концентрации агониста активации.

Практическая значимость состоит в разработке протокола подготовки и измерения тромбоцитов на сканирующем проточном цитометре, позволяющего регистрировать воздействие на популяцию тромбоцитов не только агониста активации, но и воздействие сдвиговой скорости, а также, в потенциале, влияние других манипуляций над тромбоцитами. В рамках работы определена чувствительность тромбоцитов к агонисту активации, а также проведена оценка эффективности, применяемой антитромбоцитарной терапии на основе изменения чувствительности к агонисту. Одновременно с определением чувствительности тромбоцитов к агонисту активации определяется степень влияния процедуры подготовки на пробу тромбоцитов, что позволяет учесть влияние преаналитических манипуляций на результат.

Положения, выносимые на защиту:

1. Распределение по индексу формы для нативных тромбоцитов состоит из трёх субпопуляций.
2. Значение моды индекса формы для субпопуляции неактивированных тромбоцитов составляет 0.330 ± 0.006 , частично активированных тромбоцитов составляет 0.599 ± 0.019 , полностью активированных тромбоцитов составляет 0.892 ± 0.005 (среднее значение для 20 условно-здоровых доноров)
3. Величина скачка индекса формы тромбоцитов условно здоровых доноров, необходимая для начала изменения формы, под воздействием АДФ составляет 0.137 ± 0.011 (среднее значение для 9 условно здоровых доноров).

Личный вклад автора Представленные в работе результаты были получены автором либо самостоятельно, либо при его непосредственном участии. Автор осуществлял работу на всех этапах исследования: от постановки цели и задач, выбора методов, расчёта теоретических моделей формы, описания экспериментальных распределений тромбоцитов по форме и разработки модели процесса активации и проведения расчетов с последующим анализом до обобщения и интерпретации результатов с подготовкой и оформлением публикаций.

Степень достоверности результатов обеспечивается применением современного подхода к исследованию формы тромбоцитов, показавшего свою эффективность и для других клеток крови; использованием современных статистических методов для анализа получаемых результатов; согласием результатов численного моделирования с экспериментальными измерениями и

воспроизводимостью получаемых экспериментальных данных.

Основные положения и научные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на 53-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2015 (2015 г.), на 30-м конгрессе международного общества улучшения цитометрии в Глазго, Великобритания (2015 г.), на 54-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2016 (2016 г.), на Международном молодежном научном форуме «ЛОМОНОСОВ-2017» (2017 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.)

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем.

Результаты исследований Литвиненко А.Л. опубликованы в 21 работе: из них 6 статей опубликовано в международных журналах, рецензируемых системой WoS, 1 статья представлена в российском журнале, рецензируемом в РИНЦ и 14 публикаций представлены в материалах отечественных и зарубежных научных конференций.

Публикации в международных базах данных и системы цитирования Web of Science и Scopus:

1. Yastrebova E.S. Dual-wavelength angle-resolved light scattering used in the analysis of particles by scanning flow cytometry / Yastrebova E.S., **Litvinenko A.L.**, Strokotov D.I., Vladimirov R.S., Gilev K.V., Nekrasov V.M., Karpenko A.A., Maltsev V.P. // Journal of Optics – 2021. – Vol. 23 – № 10 – P.105606.
2. **Litvinenko A.L.** Blood platelet quantification by light scattering: from morphology to activation / **Litvinenko A.L.**, Nekrasov V.M., Strokotov D.I., Moskalensky A.E., Chernyshev A.V., Shilova A.N., Karpenko A.A., Maltsev V.P. // Analytical Methods – 2021. – Vol. 13 – № 29 – P.3233–3241.
3. Yastrebova E.S. Spectral approach to recognize spherical particles among non-spherical ones by angle-resolved light scattering / Yastrebova E.S., Dolgikh I., Gilev K.V., Vakhrusheva I.V., Liz E., **Litvinenko A.L.**, Nekrasov V.M., Strokotov D.I., Karpenko A.A., Maltsev V.P. // Optics & Laser Technology – 2021. – Vol. 135 – P.106700.
4. Moskalensky A.E. The platelet shape change: biophysical basis and physiological consequences / Moskalensky A.E., **Litvinenko A.L.** // Platelets – 2019. – Vol. 30 – № 5 – P.543–548.
5. Moskalensky A.E. Method for the simulation of blood platelet shape and its evolution during activation / Moskalensky A.E., Yurkin M.A., Muliukov A.R., **Litvinenko A.L.**, Nekrasov V.M., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. // PLOS Computational Biology – 2018. – Vol. 14 – № 3 – P.e1005899.

6. **Litvinenko A.L.** Fluorescence-free flow cytometry for measurement of shape index distribution of resting, partially activated, and fully activated platelets / **Litvinenko A.L.**, Moskalensky A.E., Karmadonova N.A., Nekrasov V.M., Strokotov D. i., Konokhova A.I., Yurkin M.A., Pokushalov E.A., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. // Cytometry Part A – 2016. – Vol. 89 – № 11 – P.1010–1016.

Прочие публикации:

1. **Литвиненко А.Л.** Оценка чувствительности тромбоцитов крови человека к агонисту активации аденозиндифосфату методом сканирующей проточной цитометрии в условиях применения антитромбоцитарной терапии / **Литвиненко А.Л.**, Некрасов В.М., Четвертак Е.В., Мальцев В.П. // Актуальные Вопросы Биологической Физики И Химии – 2022. – Т. 7 – № 2 – С.286–292.

Соответствие диссертации паспорту специальности 1.5.2. Биофизика

Диссертационная работа Литвиненко Алёны Леонидовны удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени кандидат физико-математических наук и соответствует паспорту специальности 1.5.2. Биофизика (физико-математические науки) (п.п. 3)

Заключение: Диссертация Литвиненко Алёны Леонидовны «Количественное описание популяции тромбоцитов в нативном состоянии и под воздействием агониста активации» рекомендуется к защите на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Заключение принято на заседании физико-химического семинара ИХКГ СО РАН.

Присутствовало на заседании 15 чел., из них с правом решающего голоса – 15 чел. Результаты голосования: «за» – 15 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел, протокол № 2016 от «29» июня 2023 г.



Поляков Николай Эдуардович
Председатель заседания,
д-р. хим. наук,
зав. лабораторией магнитных явлений
ИХКГ СО РАН



Поздняков Иван Павлович
Секретарь заседания,
канд. хим. наук,
с.н.с. лаборатории фотохимии
ИХКГ СО РАН