

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Серёгиной Елены Александровны «Биофизические механизмы нарушения свертывания при гемолитических анемиях и остром лимфобластном лейкозе», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика

Актуальность темы

Диссертационное исследование Серёгиной Елены Александровны посвящено актуальной теме, касающейся медицины и фундаментальных задач биологии. Гиперкоагуляция, то есть повышенное свертывание крови, развивающаяся спонтанно и при некоторых патологиях, может превратиться в жизнеугрожающую проблему. Среди детской популяции развитие синдрома гиперкоагуляции не велико, однако, при гемолитических анемиях и остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ), риск развития тромбозов в 25 раз выше, чем в общей популяции. Точные механизмы развития гиперкоагуляции изучены не полностью, а стандартные методы диагностики не чувствительны к этому синдрому. До сих пор не найдено методик, способных дать оценку риску развития тромбоза, несмотря на то, что все реакции белков свертывания крови давно известны. В последнее время в практику входят методики, способные дать интегральную оценку состоянию гемостаза, в частности, динамике роста фибринового сгустка с учетом пространства и времени. Эти тесты чувствительны к биофизическим механизмам системы свертывания, в частности к сборке активных комплексов факторов на свободных фосфолипидных поверхностях. Появление патологически большого количество таких поверхностей при разрушении эритроцита у пациентов с гемолитической анемией предположено одним из механизмов развития гиперкоагуляции. Эти проблемы ставятся и решаются в представленной работе.

Структура диссертации и автореферата

Диссертация Серёгиной Е.А. имеет традиционную структуру и состоит из оглавления, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и

обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы, списка сокращений и обозначений. Список цитируемой литературы насчитывает 172 источника. Работа представлена на 146 страницах и содержит 27 рисунков, 10 таблиц. Автореферат соответствует основным идеям и выводам диссертации. В автореферате изложены все основные положения диссертации, он написан доступно, хорошо иллюстрирован.

Во **Введении** обоснована актуальность исследования механизмов развития гиперкоагуляции и поиск маркеров риска тромбозов при гемолитических анемиях и остром лимфобластном лейкозе. Охарактеризованы научная новизна, практическая значимость работы, методология исследования.

В **Обзоре литературы** представлены современные представления о системе гемостаза. Большое внимание уделено плазменному звену этой системы свертывания крови; внешнему и внутреннему каскадам. Рассмотрены петли положительной и отрицательной обратной связи при генерации тромбина. Выделены маркеры эндотелиальной дисфункции, участвующие в системе свертывания крови. Акцентируется значение заряда поверхности мембраны, вследствие чего возможно участие эритроцитарных микровезикул в образовании комплекса активных факторов системы свертывания. Достаточно подробно проанализирована информация об угрозах тромботических осложнений при гемолитических анемиях различной этиологии (серповидно-клеточная анемия, β -талассемия, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ), сфероцитоз) и остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ). Отмечается, до сих пор нет точного понимания механизмов, приводящих к тромботическим осложнениям у этих больных, а механизм активации системы свертывания при этих патологиях носит многофакторный характер. Особенное внимание было уделено системам диагностики и подчеркнуто, что традиционные коагулологические тесты (АЧТВ, ТВ, ПВ) недостаточно чувствительны для оценки тромботических осложнений у пациентов с гемолитическими анемиями и ОЛЛ, вследствие чего эти осложнения плохо диагностируются стандартными методами. Раздел заканчивается логичной постановкой задачи, где подчеркивается, что пространственно-неоднородная автоволновая природа свертывания крови не может быть оценена только по

концентрации тех или иных белков или продуктов распада фибринового сгустка, а необходима оценка пространственной составляющей этого процесса.

Раздел **Материалы и методы** полно отражает все методические подходы используемые в работе. Представлены основные современные методы диагностики состояния системы свертывания. Наряду с классическими методами коагулограммы, большое внимание уделено интегральным тестам: тромбоэластография, тест генерации тромбина, тромбодинамика. Подробно описаны методы выделения микровезикул из плазмы крови и оценки количественных и качественных параметров их прокоагулянтных свойств методом проточной цитометрии.

Результаты и обсуждение представлены в девяти взаимосвязанных разделах главы 3. В первых 3-х разделах подробно описан дизайн исследования, а также характеристики пациентов и здоровых добровольцев, описаны контрольные группы. В четвертом разделе впервые получены результаты интегральных параметров тромбодинамики у детей от 1 года. Эти параметры в целом совпадают с параметрами у взрослых от 18 лет, что хорошо сходится с данными исследований гемостаза детской популяции, где описано, что общее состояние системы свертывания ребенка после года близко к состоянию взрослого человека. Главный результат работы состоит в том, что прокоагулянтные микровезикулы, содержащие фосфатидилсерин на своей поверхности, могут влиять на пространственную скорость распространения фибринового сгустка. Этот результат достигается логичной последовательностью экспериментальных подразделов раздела 5. В первом подразделе методом проточной цитометрии оценено количество прокоагулянтных микровезикул у пациентов с гемолитической анемией. Далее, проверяются их качественные характеристики на модели пространственной динамики роста сгустка в тромбодинамике. Логично заключается, что основной вклад в гиперкоагуляцию у пациентов вносит именно патологически большое количество микровезикул, образующихся при гемолитической анемии. Большое внимание уделено поиску маркеров гиперкоагуляции у пациентов с гемолитической анемией, в 6-8 разделах показано, что оценка интегральных параметров свертывания с помощью тромбодинамики и

теста генерации тромбина может дать ряд параметров, имеющих предикторную силу относительно клиники тромбозов. В последнем разделе проводится оценка автоволнового процесса свертывания крови у пациентов с ОЛЛ. На основании экспериментальных данных и анализа терапии применяемой при ОЛЛ, разработан новый интегральный параметр для оценки риска тромбоза среди пациентов с ОЛЛ. Проведенные исследования показали, что глобальные тесты гемостаза, в частности способные измерять скорость роста фибринового сгустка, могут быть использованы как диагностические маркеры риска тромбозов.

В **Заключении** автор описывает перспективы научного и практического применения результатов диссертационной работы.

Представленные **Выводы** полностью обоснованы и не вызывают сомнения.

Оценивая диссертацию Елены Александровны, как цельное и комплексное исследование, хотелось бы, в порядке обсуждения, получить разъяснения по следующим вопросам:

1) Ожидается, что уровень эритроцитарных микровезикул у пациентов с гемолитической анемией (сфероцитоз, β -талассемия) выше, чем у доноров. Но у этих пациентов выше общий уровень прокоагулянтных микровезикул не эритроцитарного происхождения. Исследовалось ли происхождение всех прокоагулянтных микровезикул, и какой возможен механизм избыточного их образования в условиях развития гемолитической анемии?

2) Метод тромбодинамика реализуется через активацию тестируемой плазмы иммобилизованным тканевым фактором, и в этих условиях видно, что выделенные микровезикулы значительно ускоряют процесс свертывания. Но возможно ли активация этого процесса только микровезикулами, без стартового участия тканевого фактора, и проверялась ли эта возможность в экспериментальных условиях?

3) Для некоторых пациентов, несмотря на высокий уровень прокоагулянтных микровезикул, показатели характеризующие систему свертывания в т.ч. параметры тромбодинамики остаются в пределах нормы. Какие в системе гемостаза возможны компенсационные механизмы, позволяющие

удерживать эти показатели в пределах нормы, несмотря на системное воздействие прокоагулянтных микровезикул?

4) В работе проведено сравнение состояния пациентов с тяжелым гемолизом во время обострения и в стабильном состоянии. Показано, что гиперкоагуляция развивается уже в детском возрасте. Однако клинические случаи тромбозов указаны для взрослых пациентов, с чем связано это ограничение?

5) В работе описан повышенный риск тромбозов при ОЛЛ: до 70% пациентов сталкиваются с этим осложнением. Есть ли понимание о механизмах такого тромбогенного состояния, ведь общий процент тромбозов в детской популяции составляет примерно 0,007%?

Сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не умаляют достоинств данной работы и не ставят под сомнение обоснованность основных положений и выводов.

Диссертационная работа обладает **научной новизной**, а именно: впервые показано, что в основе развития гиперкоагуляции у пациентов с гемолитическими анемиями лежит увеличение количества прокоагулянтных микровезикул, при этом их свойства значимо не отличаются от свойств микровезикул здоровых доноров. Разработаны интегральные показатели для оценки риска тромботических осложнений у детей и взрослых с гемолитическими анемиями, а также у детей с ОЛЛ.

Практическая значимость результатов работы определяется клинической важностью проблемы гиперкоагуляции и тромбозов у пациентов гематологического и онкогематологического профиля. Представленная работа практически является законченной разработкой для внедрения в клиническую практику параметров, способных оценить реальное клиническое состояние пациентов, что очень ценно и редко встречается в диссертационных работах.

Положения, выносимые на защиту, отражают главное содержание работы. Основные результаты диссертации опубликованы в 27 научных работах, включая 12 статей в рецензируемых журналах, что отвечает формальным требованиям ВАК.

Заключение. Диссертационная работа **Е.А. Серёгиной «Биофизические механизмы нарушения свертывания при гемолитических анемиях и остром лимфобластном лейкозе»** представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задач, имеющей существенное значение для биологии и медицины. Рецензируемая диссертация отвечает требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 01 октября 2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Серёгина Елена Александровна заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Официальный оппонент,

Главный научный сотрудник Лаборатории сравнительной физиологии дыхания
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института
эволюционной физиологии и биохимии им И.М. Сеченова Российской академии
наук

доктор биологических наук  Игорь Викторович Миндукшев

23 марта 2021 г.

Адрес: 104223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44

м.т. +7 9129794793, раб. 8 (812) 5528554

e-mail: iv_mindukshev@mail.ru

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

Ученый секретарь ИЭФБ РАН.  Гальперина Е.И.

