

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИМЕНИ В. А. АЛМАЗОВА»



197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

Тел/факс +7 (812) 702-37-30

e-mail: fmc@almazovcentre.ru

ОГРН 1037804031011 ИНН 7802030429 КПП 781401001

№ 03 2022 № 02-05-2731/22

на № _____ от _____

Заместитель генерального директора по
научной работе Федерального
государственного бюджетного
учреждения «Национальный
медицинский исследовательский центр
имени В.А. Алмазова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации
доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН



А.О. Конради

«14» 2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального* государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической значимости диссертации Автаевой Юлии Николаевны на тему: «Взаимодействие клеток крови с адгезивной белковой поверхностью в условиях контролируемого потока и разработка методики диагностики нарушений клеточного гемостаза на основе микрофлюидной технологии», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.10 «Клиническая лабораторная диагностика», 3.1.28 «Гематология и переливание крови».

Актуальность темы исследования

Диссертационное исследование Автаевой Ю.Н. посвящено важной проблеме – изучению взаимодействия клеток крови с адгезионными белками при реализации гемостатических реакций и разработке новой методики диагностики нарушений гемостаза. Нарушения в системе свертывания крови вносят свой вклад в патогенез практически любого заболевания, а вопрос адекватной лабораторной оценки нарушений гемостаза остается основным в клинической лабораторной диагностике, не смотря на существующие методы и подходы для определения состояния как плазменного гемостаза, так и функциональной активности тромбоцитов. Постоянное развитие

молекулярной биологии позволило приблизиться к пониманию механизмов гемостатических реакций на уровне взаимодействия отдельных клеток и молекул. В последние годы стало понятно, что процессы свертывания крови, развития тромбозомболических осложнений и воспаления, неразрывно связаны между собой и регулируются такими молекулами как фибриноген, фактор Виллебранда и им подобные. При этом фактор Виллебранда – ключевой компонент активации клеточного гемостаза, функции которого существенно меняются в зависимости от скорости тока крови в сосудистом русле. Нарушение функций фактора Виллебранда, его врожденные дефекты, усиление протеолиза, вызванное различными причинами, приводят к развитию геморрагических синдромов (болезнь Виллебранда, синдром Бернара-Сулье, синдром Хейда). В тоже время патологическая активация фактора Виллебранда связана с развитием тромбозомболических осложнений ишемической болезни сердца и, как показали наблюдения последних двух лет, с тромботическими изменениями у больных с COVID-19. Как уже было отмечено, функционирование фактора Виллебранда зависит от скорости тока крови, отсюда важно анализировать *in vitro* процессы активации гемостаза, в том числе активации тромбоцитов как компонента клеточного гемостаза, в условиях, максимально приближенных к физиологическим. Однако в арсенале инструментов клинической лабораторной диагностики в настоящее время мало технологий, которые позволяют оценить взаимодействие клеток крови с адгезионными молекулами в условиях потока и получить информацию об активации гемостаза, реально отражающую процессы, происходящие *in vivo*.

Диссертант подробно описал состояние проблемы в данной области клинической лабораторной диагностики с точки зрения имеющихся методов и подходов и их ограничений, а также важность изучения взаимодействий клеток крови с адгезионными белками с точки зрения патогенеза клинически значимых гематологических нарушений.

Таким образом, актуальность исследования Автаевой Ю.Н. не вызывает сомнения и затрагивает обе специальности, по которым диссертационная работа «Взаимодействие клеток крови с адгезивной белковой поверхностью в условиях контролируемого потока и разработка методики диагностики нарушений клеточного гемостаза на основе микрофлюидной технологии» представляется к защите – 14.03.10 «Клиническая лабораторная диагностика», 3.1.28 «Гематология и переливание крови».

Исходя из актуальности проблемы, диссертантом сформулирована цель работы и пять задач, которые соответствуют двум заявленным специальностям.

Научная новизна и практическое значение работы

Диссертантом создана и впервые апробирована микрофлюидная система регистрации кинетики адгезии клеток крови к адгезивной белковой поверхности в условиях контролируемого потока, способная работать как с образцами обогащенной тромбоцитами плазмы, так и цельной крови. Впервые исследован белково-клеточный состав структур, образовавшихся в результате взаимодействия образцов крови с белковыми поверхностями, в условиях контролируемого потока. С помощью новой разработанной технологии Автаева Ю.Н. впервые оценила влияние фактора Виллебранда на адгезию клеток крови к покрытой адгезивным белком поверхности в условиях потока у пациентов с ишемической болезнью сердца, с синдромом Хейда, у больных с новой коронавирусной инфекцией COVID-19.

Практическая значимость данного диссертационного исследования состоит в разработке новой технологии для регистрации кинетики адгезии клеток крови к поверхности, покрытой белком (фибриноген, коллагены), позволяющей оценивать влияние фактора Виллебранда на активацию и адгезию клеток крови в условиях потока. Разработанная микрофлюидная система может лечь в основу создания новых отечественных приборов для практического применения в клинической лабораторной диагностике. Кроме

того, результаты, полученные при оценке клеточного гемостаза с использованием микрофлюидной системы, у больных с различными сердечно-сосудистыми, гематологическими и инфекционными заболеваниями внесут свой вклад в понимание патогенеза развития тромбоэмболических осложнений при указанных состояниях.

**Степень обоснованности и достоверности научных положений,
выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Диссертационная работа Автаевой Ю.Н. основана на достаточном клиническом материале, а также на глубоком анализе литературных данных, который приведен в разделе «Обзор литературы». В обзоре литературных данных подробно описан как сам фактор Виллебранда – ключевая молекула адгезии и активации клеточного гемостаза, так и патологии, ассоциированные с его дисфункцией. Следует отметить раздел, описывающий влияние гидродинамических сил на конформацию и размер мультимеров фактора Виллебранда, так как оценка адгезии и активации клеток крови в используемой диссертантом новой микрофлюидной системе происходит в условиях, имитирующих поток крови в сосудистом русле. Кроме того, диссертант всесторонне анализирует существующие методы и подходы, которые основаны на аналогичных технологических решениях, рассмотрены ограничения существующих методов и дано обоснование необходимости собственных разработок.

Само исследование Автаевой Ю.Н. состояло из трех этапов: 1-ый – апробация созданной микрофлюидной системы для регистрации кинетики адгезии клеток крови к фибриногену в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы и цельной крови здоровых добровольцев; 2-ой – апробация созданной микрофлюидной системы для регистрации кинетики адгезии клеток крови к коллагену I типа в образцах цельной крови здоровых добровольцев и исследование с помощью методов микроскопии структур, образовавшихся в результате взаимодействия цельной крови с коллагеном I типа; 3-й – оценка кинетики адгезии клеток крови к белковым поверхностям в образцах

обогащенной тромбоцитами плазмы и цельной крови больных с синдромом Хейда, тяжелым стенозом клапана аорты, ранней ИБС и новой коронавирусной инфекцией.

В исследование были включены 28 здоровых добровольцев, 7 больных с тяжелым стенозом клапана аорты, 6 пациентов с синдромом Хейда, 22 больных с ранней ишемической болезнью сердца и 17 больных с COVID-19, что является достаточным для получения достоверных результатов в запланированных экспериментах, условия преаналитического этапа которых требуют выполнения в течении не более трех часов с момента взятия нативного биоматериала. Для статистической обработки полученных данных использовали адекватные методы непараметрического анализа.

В разделе материалы и методы приведено подробное описание микрофлюидной системы, принцип регистрации результатов измерений, а также преаналитический этап подготовки образцов.

Результаты всех трех этапов работы изложены в соответствующих главах диссертационной работы, достаточно проиллюстрированных рисунками – схемами, диаграммами и фото. Автаевой Ю.Н. показано, что в микрофлюидной системе в результате взаимодействия образцов крови с поверхностью, покрытой коллагеном I типа, в условиях потока, образуются белково-клеточные структуры, которые состоят из тромбоцитов и фактора фон Виллебранда с многочисленными включениями лейкоцитов. При этом у больных с синдромом Хейда, при отсутствии снижения общего уровня фактора Виллебранда в плазме, практически отсутствовал вклад взаимодействия тромбоцитарного рецептора для фактора Виллебранда GP Ib и фактора Виллебранда в адгезию клеток крови к фибриногену в условиях потока. Напротив, исследование крови больных с ишемической болезнью сердца выявило повышенный вклад «фактор Виллебранда – GP Ib» зависимых реакций в адгезию клеток крови к фибриногену в потоке при нормальном уровне фактора Виллебранда в плазме. А у пациентов с COVID-19 был выявлен максимальный вклад взаимодействия GP Ib и фактора

Виллебранда в адгезию клеток крови к фибриногену в условиях потока, который ассоциировался со значительным повышением уровня фактора Виллебранда в крови. Таким образом, созданная микрофлюидная система, позволяет в реальном времени регистрировать кинетику адгезии клеток крови к поверхностям, покрытых фибриногеном или коллагеном типа I, в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы и цельной крови в условиях контролируемого потока и оценивать состояние клеточного гемостаза при различных патологических состояниях.

По результатам проведенного исследования был предложен и внедрен в научную и практическую лабораторию клеточного гемостаза Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации метод исследования адгезии клеток крови к адгезивной белковой поверхности у больных с различными патологиями.

Содержание диссертации

Диссертационная работа Автаева Ю.Н. построена по традиционному плану, изложена на 112 страницах машинописного текста и состоит из введения, 5 глав (обзора литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждения результатов), заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Список литературы включает 149 источников. Полученные данные находятся в соответствии с поставленными задачи, отражены в выводах и в рекомендациях. Текст диссертации иллюстрирован 26-ю рисунками и содержит 1 таблицу.

Раздел «Введение» содержит полную информацию об актуальности, степени разработанности и научной новизне исследования, а также цели и задачах исследования. В разделе «Обзор литературы» Автаевой Ю.Н. показано хорошее знание литературы по изучаемому вопросу, а также способность применить эти знания при планировании работы и постановке задач. Раздел «Материалы и методы» содержит подробное описание

используемых методик и исследуемых групп. В двух главах, описывающих результаты исследования, включены все полученные автором данные и решение поставленных в работе задач. Раздел «Обсуждение результатов» написан четко и лаконично, при этом содержит необходимую информацию о соответствии полученных диссертантом результатов и данных, опубликованных другими исследователями.

Положения, выносимые на защиту, соответствуют двум заявленным специальностям 14.03.10 «Клиническая лабораторная диагностика» и 3.1.28 «Гематология и переливание крови».

Основные положения научного исследования обсуждены на международных и всероссийских конференциях и конгрессах. По теме диссертационного исследования опубликована 21 научная работа, из них 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований (2 в международных журналах), 1 глава в монографии и 2 патента на изобретение.

Содержание автореферата и печатных работ соответствует материалам диссертации.

Значимость полученных результатов

В диссертационном исследовании Автаевой Ю.Н. разработана методика для диагностики нарушений клеточного гемостаза на основе микрофлюидной технологии, которая может стать эффективным инструментом для изучения кинетики адгезии клеток крови к поверхностям, покрытым адгезивным белком, в условиях контролируемого потока. Возможность применения данной методики для анализа адгезии клеток крови, была проверена в обогащенной тромбоцитами плазме и цельной крови здоровых добровольцев. Далее возможность применения разработанной методики была оценена при анализе адгезии клеток крови к фибриногену в образцах цельной крови пациентов с тяжелой патологией - синдромом Хейда, тяжелым стенозом клапана аорты, ишемической болезнью сердца и новой коронавирусной инфекцией. Полученные в работе результаты

свидетельствуют о возможности регистрации с помощью микрофлюидной системы кинетики адгезии клеток крови к белковым поверхностям при движении через проточную камеру цельной крови или обогащенной тромбоцитами плазмы в реальном времени *in vitro*, что максимально соответствует физиологии гемостаза *in vivo*. Значимость полученных результатов как для клинической лабораторной диагностики, так и для специалистов гематологов не вызывает сомнения.

Личный вклад автора

Автором работы проведен анализ литературы, посвященной изучаемой проблеме, разработана концепция исследования. Автором разработан метод регистрации адгезии клеток крови к белковой поверхности в условиях потока. Автором исследована адгезия клеток крови к фибриногену и коллагену у здоровых добровольцев и больных. Автором осуществлена обработка результатов со статистическим анализом, написаны статьи и тезисы, подготовлен текст диссертации, разработаны практические рекомендации.

Рекомендации по использованию результатов и выводов, полученных в диссертации

Считаем целесообразным и применимым на практике внедрение микрофлюидной системы регистрации кинетики адгезии клеток крови к адгезивной белковой поверхности в условиях контролируемого потока для выявления и мониторинга нарушений клеточного гемостаза, в том числе общей адгезии клеток крови к фибриногену и зависимых от взаимодействия рецептора GP Ib и фактора Виллебранда адгезивных реакций, у больных с гематологическими, сердечно-сосудистыми, воспалительными заболеваниями, патогенез которых подразумевает развитие геморрагических и/или тромбоэмболических осложнений.

Замечания и вопросы

Замечаний по диссертационному исследованию нет. В ходе ознакомления с работой возникли следующие вопросы:

- 1) По мнению диссертанта, для оценки каких еще гематологических нарушений, кроме включенных в данное исследование, будет актуально применение разработанной микрофлюидной системы?
- 2) Проводилась ли предварительная оценка клинической информативности (чувствительности, специфичности) методики регистрации кинетики адгезии клеток крови к белковым поверхностям в условиях контролируемого потока с помощью микрофлюидной системы?

Заключение


Диссертационная работа Автаевой Юлии Николаевны «Взаимодействие клеток крови с адгезивной белковой поверхностью в условиях контролируемого потока и разработка методики диагностики нарушений клеточного гемостаза на основе микрофлюидной технологии», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.10 «Клиническая лабораторная диагностика», 3.1.28 «Гематология и переливание крови», является завершенной научно-квалификационной работой по актуальной теме, в которой решена важная задача разработки нового метода оценки клеточного гемостаза с помощью микрофлюидной технологии в условиях контролируемого потока и применения данной методики для выявления геморрагических и тромбоэмболических нарушений у больных с гематологическими, сердечно-сосудистыми и воспалительными заболеваниями, имеющая существенное значение в области клинической лабораторной диагностики и гематологии.

По своей актуальности, объему выполненного исследования, научной новизне, теоретической и практической значимости, обоснованности выводов, диссертация полностью соответствует требованиям п.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 в актуальной редакции, а соискатель заслуживает присуждения ученой степени кандидата


медицинских наук по специальностям 14.03.10 «Клиническая лабораторная диагностика», 3.1.28 «Гематология и переливание крови».

Отзыв на диссертацию обсужден и одобрен на совместном заседании кафедры лабораторной медицины и генетики и кафедры факультетской терапии с клиникой лечебного факультета института медицинского образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации от 11 марта 2022 года протокол № 2.

Профессор кафедры лабораторной медицины
и генетики института медицинского образования
ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России
доктор биологических наук, доцент
(14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика,
03.02.07 – генетика)

 О.В. Сироткина

Доцент кафедры факультетской терапии
с клиникой лечебного факультета
института медицинского образования
ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России
кандидат медицинских наук, доцент
(14.01.21 — гематология и переливание крови)

 Г.Н. Салогуб

Подпись доктора биологических наук, доцента Сироткиной Ольги Васильевны и кандидата медицинских наук, доцента Салогуб Галины Николаевны заверяю:

Ученый секретарь
ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»
Минздрава России
доктор медицинских наук, профессор



А.О. Недошивин

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 197341, г. Санкт-Петербург, улица Аккуратова, д.2
Телефон: +7 (812) 702-37-00
e-mail: fmrc@almazovcentre.ru
Web-сайт: <http://www.almazovcentre.ru>