

УТВЕРЖДАЮ

Директор Института биофизики клетки  
Российской академии наук - обособленного  
подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН  
доктор биологических наук  
Моренков О.С.



*[Handwritten signature]*

14 марта 2021 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу **Серёгиной Елена Александровны** «Биофизические механизмы нарушения свертывания при гемолитических анемиях и остром лимфобластном лейкозе», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности биофизика – 03.01.02

**Актуальность темы исследований.** Изучение механизмов свертывания крови и механизмов развития нарушений этого процесса ведется уже много десятилетий и не теряет своей актуальности. Изменения в данной системе организма человека может привести к серьезным последствиям, вплоть до смертельного исхода. Остановка кровотечений, предотвращение и лечение тромбозов является одной из массовых проблем современной науки, так как любое вмешательство в каскад свертывания крови часто приводит к смещению во многих звеньях этой системы. Существует группа патологий, объединенных единым симптомом – гемолизом эритроцитов. Эти заболевания получили общее название гемолитические анемии. Клиника этих заболеваний разнообразна у детей и взрослых, объединяет их наличие высокого (в 25 раз выше, чем в общей популяции) тромботического риска. Известно, что пациенты детского возраста с диагнозом острый лимфобластный лейкоз(ОЛЛ) также имеют высокий риск развития симптоматического тромбоза (до 36%), в то

время, как риск развития асимптоматического (катетер-ассоциированного) тромбоза достигает 70%. Показано, что эти патологии характеризуются клиникой жизнеугрожающих тромбозов, однако, детальных исследований механизмов повышенного свертывания - гиперкоагуляции, а также поиск лабораторных факторов рисков для этих патологий не был успешен.

Диссертационная работа Е.А. Серёгиной посвящена исследованию биофизических механизмов процессов развития гиперкоагуляции при гемолитических анемиях и остром лимфобластном лейкозе. Проведенное в работе исследование и полученные результаты являются актуальными и представляют несомненный интерес для понимания механизмов нарушений системы свертывания при данных патологиях и для дальнейшей разработки новых лекарственных средств и методов диагностики этих состояний.

**Цель диссертационной работы** заключалась в исследовании изменений системы свертывания крови у пациентов с гемолитическими анемиями, а также у пациентов с ОЛЛ; изучение механизмов влияния микровезикул на развитие гиперкоагуляции у пациентов с гемолизом на модели пространственной динамики роста сгустка.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи: 1) исследовать характеристики и общее состояние системы свертывания крови у пациентов с гемолитическими анемиями, используя максимально полный набор современных методов; 2) сравнить концентрации микровезикул у пациентов с гемолитической анемией и у здоровых доноров методом проточной цитометрии и оценить вклад микровезикул в гиперкоагуляцию, наблюдаемую у пациентов с гемолитическими анемиями; 3) оценить, есть ли качественные различия в прокоагулянтных свойствах микровезикул у пациентов с гемолитической анемией и у здоровых доноров; 4) исследовать изменения гемостаза и пространственной динамики роста сгустка у пациентов детского возраста с ОЛЛ на фоне специфической терапии; 5) разработать интегральный

показатель, позволяющий прогнозировать вероятность тромботических осложнений у пациентов с ОЛЛ и с гемолитическими анемиями.

**Основное содержание работы.** Диссертационная работа Серёгиной Е.А. построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, непосредственно результатов исследования, заключения, выводов, списка цитированной литературы, включающего 172 наименования, списка сокращений и обозначений, а также благодарностей.

Во введении обоснована актуальность, достаточно аргументировано изложен выбор основного направления и объектов исследования, экспериментальных методов и способов анализа полученных результатов. Кроме того, раскрыта научная новизна и практическая значимость работы по исследованию механизмов развития гиперкоагуляции у пациентов с гемолизом и у пациентов с ОЛЛ.

**Глава 1** (литературный обзор) носит аналитический характер и содержит современные данные о механизмах гемостаза, функциях и роли плазменного звена, тромбоцитов, эндотелия и везикул в свертывании крови. Обзор демонстрирует достаточную компетентность автора в данной области. Опираясь на литературные данные, автор подчеркивает актуальность исследования механизмов развития гиперкоагуляции, а именно предположения вклада патологически образующихся при гемолизе прокоагулянтных микровезикул, на которых возможна сборка комплексов активных факторов свертывания. Такие комплексы могут значительно увеличивать пространственную динамику образования тромба.

В **Главе 2** представлены материалы и методы, применяемые автором работы. Из данного раздела следует, что работа выполнена на современном методологическом уровне, а комплексное использование нескольких методов исследования системы свертывания обеспечивает надежность и достоверность полученных данных.

Результаты экспериментов и их обсуждение представлены в **Главе 3**. В первом, втором и третьем разделе данной главы охарактеризованы демографические и клинические данные пациентов и здоровых добровольцев, а также дизайны исследований состояния свертывания у пациентов с гемолитическими анемиями и с ОЛЛ на фоне специфической для конкретного заболевания терапии. В четвертой части проведено детальное исследование особенностей развития системы гемостаза у детей от одного года до 17 лет. В результате проведенного исследования были впервые определены количественные параметры роста фибринового сгустка в тесте тромбодинамика для детской популяции. Было показано, что после года жизни, интегральная оценка системы свертывания крови показывает соответствие с параметрами у взрослого человека, что хорошо соотносится с известными представлениями о том, что основной этап развития и созревания системы свертывания, включая изменения в концентрациях естественных про- и антикоагулянтных факторов, происходит преимущественно в течение 1 года жизни. В пятом разделе данной главы охарактеризован вклад микровезикул в гиперкоагуляции у пациентов с гемолитическими анемиями. В результате было выявлено, что у пациентов с тяжелым течением гемолитической анемии наблюдается большее количество прокоагулянтных (фосфатидилсерин-положительных) микровезикул и эритроцитарных (гликофорин-положительных) микровезикул. Микровезикулы были выделены из плазмы крови и помечены специфическими антителами для оценки методом проточной цитометрии. Известно, что наибольший вклад в скорость распространения сгустка в пространстве вносят микровезикулы, имеющие на своей поверхности фосфатидилсерин. В данной работе было впервые показано, что пациенты с обострением гемолиза имеют большее количество прокоагулянтных микровезикул, в том числе эритроцитарного происхождения. Однако прокоагулянтные свойства микровезикул пациентов при титровке в очищенном пуле плазмы здоровых добровольцев при сравнении

с микровезикулами, выделенными из плазмы здоровых людей, оказались одинаковы.

В шестом, седьмом и восьмом разделе обоснована чувствительность интегральных тестов оценки свертывания крови к развитию гиперкоагуляции у пациентов с различными формами гемолитической анемии. Впервые показано, что интегральные тесты, в особенности способные оценить пространственную динамику роста сгустка, чувствительны к усилению свертывания у взрослых и детей с гемолитическими анемиями, а также оценивают риски развития клинических тромбозов. В девятом разделе была разработана тестовая панель, позволяющая не только оценить нарушения в распространении автоволны роста фибрина у пациентов с ОЛЛ, но и напрямую выделить реальные группы риска развития тромбозов у таких пациентов. Показано, что среди механизмов развития гиперкоагуляции при ОЛЛ может лежать нарушения в системе лизиса, а также эндотелиальная дисфункция.

Таким образом, в ходе выполнения данной работы автором получены важные данные, позволяющие лучше разобраться в механизмах нарушения свертывания крови при гемолитических анемиях. В частности объясняются механизмы развития гиперкоагуляции в процессе обострения гемолиза за счет повышения количества циркулирующих в кровотоке прокоагулянтных микровезикул. А также сделано предположение, что среди возможных механизмов развития тромбозов при ОЛЛ лежит эндотелиальная дисфункция и дисфункция системы фибринолиза, разработан интегральный параметр оценки риска тромбоза у детей с ОЛЛ.

Далее приводится обсуждение полученных результатов, их сравнение с ранее опубликованными данными, а также обсуждаются перспективы их практического применения.

Резюмируя все вышесказанное, можно выделить следующие основные положительные качества диссертации. Работа выполнена на хорошем экспериментальном уровне с привлечением проточной цитометрии,

интегральных и стандартных методов оценки системы свертывания крови и состояния эндотелия. Достоверность полученных результатов достигается статистической обработкой измерений. Основные положения и результаты работы опубликованы в профильных журналах рекомендованных ВАК и многократно докладывались на российских и международных конференциях.

В целом, диссертация написана хорошим языком с необходимой степенью аргументированности. Представленный в ней иллюстративный материал нагляден и удобен для восприятия. Все полученные в работе результаты являются новыми, а их достоверность обусловлена применением современного оборудования, надежных и адекватных методов исследования.

К недостаткам работы стоит отнести наличие опечаток. Кроме того почему-то в выводах не упомянуты полученные впервые в рамках работы количественные параметры интегральной оценки гемостаза, характеризующие свертывание крови у детей от одного года. Несущественным недостатком также является нарушения синтаксической структуры некоторых предложений, что ведет к сложности восприятия излагаемого в них материала.

Перечисленные недостатки относятся, скорее к редактированию текста, и не влияют на научную ценность полученных в диссертации результатов. Их достоверность, новизна и практическая значимость для биомедицинских приложений не вызывают сомнений. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации, в нем отражены главные идеи проведенного исследования.

По материалам диссертации опубликовано 27 научных работ, в том числе в виде статей в отечественных и в международных журналах, рекомендованных ВАК и включенных в базу цитирования Web of Science, патентов на изобретения и тезисов докладов на конференциях различного уровня

## **Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов**

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, выделенных из крови здоровых добровольцев.

Проведен сравнительный анализ показателей стандартной коагулограммы и интегральных показателей, в результате чего наиболее оптимальными признаны интегральные тесты, адекватно регистрирующие развитие гиперкоагуляции, в первую очередь, за счет скорости роста фибринового сгустка.

Разработан новый интегральный показатель для оценки риска реальных тромботических осложнений у детей с ОЛЛ, получающих терапию по протоколу ALL-MB-2015.

### **Научно-практическая ценность.**

Возможность выявлять склонность к тромбозам по биофизическим характеристикам свертывания крови с помощью глобальных тестов гемостаза позволяет широко применять эти методы как для проведения оценки состояния системы гемостаза у пациентов со склонностью к тромбообразованию, так и для изучения действия препаратов, воздействующих на свертывание крови.

Результаты работы могут быть использованы в ФГБУ Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, Российском национальном исследовательском медицинском университете им. Н. И. Пирогова, ФГБУ Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

Давая общую оценку диссертации Е.А. Серёгиной, можно заключить, что она представляет собой законченную научно-квалификационную работу. Диссертационная работа Е.А. Серёгиной удовлетворяет требованиям, установленным пунктами 9 – 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 01 октября 2018 году № 1168, а ее автор заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Отзыв был заслушан и одобрен на семинаре Лаборатории механизмов рецепции Института биофизики клетки - обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований» Российской академии наук» (ИБК РАН) «19 марта 2021 г. (Протокол №15).

Отзыв составил:

Доктор биологических наук, профессор



(Новоселова Елена Григорьевна)

Почтовый адрес: ул. Институтская, д. 3, Пущино, Московская обл., 142290

Тел. (4967) 739-399

E-mail: elenanov\_06@mail.ru

Подпись удостоверяю



*зав. кафедрой*  
*ЕГ 22.03.2021*