

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Литвинова Рустема Игоревича о диссертационной работе Жалялова Ансара Сайяровича на тему «Исследование пространственной динамики роста и лизиса фибринового сгустка в условиях тромболитической терапии», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - Биофизика

Актуальность темы. Диссертационная работа А. С. Жалялова посвящена исследованию пространственной динамики свертывания крови и фибринолиза в условиях их одновременной активации. Свертывание крови и фибринолиз являются взаимосвязанными системами крови, регулирующими образование и разрушение фибриновых сгустков в организме. Образование сгустка происходит вследствие контакта крови с поврежденными или измененными тканями, а также в результате появления в крови веществ, инициирующих внутрисосудистое свертывание крови. При этом происходит активация коагуляционного ферментативного каскада, что приводит к образованию желеобразного сгустка фибрина, препятствующего кровопотере (гемостаз) или блокирующего кровоток (тромбоз). Одновременно с образованием сгустка включается система фибринолиза, отвечающая за его ферментативное разрушение. В клинической практике для удаления обтурационных сгустков, называемых тромбами, проводится тромболитическая терапия – введение в кровоток лекарственных препаратов, активирующих систему фибринолиза. Если причина образования тромбов не устранена, то возможна ситуация, когда на фоне тромболитической терапии в крови пациента будут образовываться новые тромбы, поэтому исследование одновременно протекающих процессов свертывания крови и фибринолиза является важной научной и практической задачей.

Функционирование систем свертывания крови и фибринолиза происходит в изменяющейся и пространственно неоднородной среде – ферменты перемещаются в пространстве как путем диффузии, так и с током крови, поэтому при исследовании процессов гемостаза важно учитывать не только кинетику, но и пространственный компонент биохимических реакций. Работа А. С. Жалялова является, возможно, первым исследованием, где изучается сопряжение пространственной динамики реакций свертывания крови и фибринолиза. Такой подход воспроизводит процессы, происходящие как при патофизиологической активации фибринолиза, так и при

тромболитической терапии, что определяет научную значимость и актуальность рецензируемой работы.

Диссертация А. С. Жалялова построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, цели и задач исследования, описания материалов и методов, а также собственных результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Диссертация имеет приложения и список цитируемой литературы, насчитывающий 185 источников. Работа представлена на 117 страницах и содержит 29 рисунков, 6 таблиц.

Во **введении** обоснована актуальность исследования пространственной динамики процессов свертывания крови и лизиса сгустков и тромбов в условиях тромболитической терапии. Охарактеризованы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология исследования, представлена информация об апробации диссертации.

В **обзоре литературы** изложены современные представления о работе систем свертывания крови и фибринолиза, об их взаимосвязи и регуляции. Отдельный раздел посвящен методам исследования системы фибринолиза, описаны их преимущества и недостатки. Охарактеризованы принципы тромболитической терапии; подчеркнута важность лабораторного контроля для профилактики и прогноза геморрагических осложнений. Из обзора следует, что в современном арсенале лабораторных методов изучения фибринолиза отсутствуют методы, учитывающие пространственную составляющую этого процесса, что подчеркивает актуальность данной диссертационной работы.

Хотя в целом обзор литературы адекватно отражает современное состояние проблемы, по этому важному разделу диссертации есть замечания.

- *Далеки от полноты сведения о связи фибринолиза со структурой фибрина, которые, к тому же, рассеяны по разным главам литературного обзора. Физические основы фибринолиза индивидуальных волокон фибрина и всей фибриновой сети заслуживают более подробного освещения в сконцентрированном виде.*

- *В обзоре вскользь упоминается о связи фибринолиза с тромбоцитами и совсем ничего не говорится о связи фибринолиза с контракцией сгустков крови, индуцируемой тромбоцитами. Между тем, такая связь существует, является предметом интенсивных исследований и имеет большое практическое значение.*

- *При описании строения фибриногена (страница 16) автор пользуется устаревшей номенклатурой (D-домен, E-домен, α C домен), в то время как существует*

современная номенклатура, рекомендованная Научным комитетом по стандартизации Международного общества по тромбозу и гемостазу.

На основании данных литературы, автор сформулировал цель и вытекающие из нее задачи диссертационного исследования.

Цель рецензируемой диссертационной работы определена как изучение пространственной динамики роста и растворения фибринового сгустка в условиях, моделирующих тромболитическую терапию.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать экспериментальную методику исследования пространственной динамики роста и лизиса фибринового сгустка в условиях, моделирующих рост сгустка в период тромболитической терапии, на базе системы для исследования пространственного роста сгустка “Тромбодинамика” (ООО Гемакор).

2. Установить зависимость типов и параметров пространственного лизиса сгустка от концентрации тканевого активатора плазминогена (ТПА).

3. Определить влияние скорости распространения волны свертывания на скорость распространения волны лизиса.

4. Исследовать влияние высоких концентраций тромболитических препаратов на пространственную динамику свертывания и лизиса.

В описании **материалов и методов** исследования подробно изложена процедура подготовки плазмы, методы измерений параметров роста и лизиса сгустка в системе “Тромбодинамика”, процедура обработки экспериментальных данных, а также описана схема компьютерного моделирования роста и лизиса сгустка, указаны наименования используемых препаратов и условия проведения экспериментов.

• По этому разделу есть терминологический вопрос: почему оптическую регистрацию размеров сгустка в системе «Тромбодинамика» автор называет «видеомикроскопией»? Световая микроскопия предполагает микронный размер объектов, тогда как размер сгустка измеряется миллиметрами. Кроме того, серийное фотографирование с интервалом 6 секунд – это не совсем видеорегистрация. Термин «видеомикроскопия», хотя и используется в литературе применительно к тромбодинамике, является, на наш взгляд, не точным.

Результаты собственных исследований представлены в девяти взаимосвязанных разделах главы 3. Главный результат состоит в том, что пространственный лизис фибринового сгустка, образованного в присутствии терапевтических концентраций ТПА, начинается там же, где происходит свертывание, т. е. вблизи или на инициирующей поверхности, покрытой тканевым фактором. При исследовании разных концентраций ТПА было установлено, что лизис фибрина может происходить по 3-м возможным сценариям: 1) фронт лизиса распространяется изнутри вновь сформированного сгустка в противоположные стороны, 2) фронт лизиса распространяется от активирующей свертывание поверхности и следует за фронтом образования фибрина вплоть до полного его растворения и 3) фронт лизиса распространяется от активирующей свертывание поверхности, следует за фронтом образования фибрина и останавливается через несколько минут после начала фибринолиза. В дополнение к эффектам ТПА, в разделе 3.4 описаны эксперименты в присутствии урокиназного активатора плазминогена и стрептокиназы. Показано, что форма волны пространственного лизиса сгустка не зависит от типа активатора плазминогена. В разделе 3.5 показано, что время начала лизиса и его скорость определяются концентрацией ТПА. В разделах 3.6 и 3.7 описаны результаты компьютерного моделирования процессов свертывания и лизиса в сопоставлении с экспериментальными данными *in vitro*. Параметры компьютерного моделирования в целом соответствовали экспериментальным измерениям, хотя были и существенные отличия. В разделе 3.8 описаны эксперименты по исследованию связи между скоростью распространения волны лизиса и скоростью направленного образования и распространения фибрина, которая варьировалась путем добавления прокоагулянтов или антикоагулянтов. Показано, что скорость движения фронта лизиса линейно зависит от скорости распространения волны свертывания. В заключительном разделе 3.9 описана активация свертывания по при добавлении высоких концентраций фибринолитических препаратов. Установлено, что гиперкоагуляция происходит, благодаря прямой активации фактора IX плазмином.

Обсуждение полученных результатов проводится путем сопоставления с данными литературы, а также сравнения результатов *in vitro*, *ex vivo* и *in silico*.

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

Характеризуя работу в целом, следует признать, что диссертация А. С. Жалылова выполнена на современном методическом уровне, с использованием

адекватных поставленным задачам экспериментальных и теоретических подходов. Автором получены новые научные результаты о пространственном сопряжении реакций свертывания крови и фибринолиза, которые могут иметь как фундаментальное, так и прикладное значение.

Вместе с тем, считаю нужным указать на недостатки диссертационной работы и спорные положения, заслуживающие обсуждения.

- *Принято считать, что есть два типа фибринолиза: «внутренний», когда активатор плазминогена есть в крови изначально и начинает действовать одновременно с образованием фибрина, или «внешний», когда активатор плазминогена добавлен уже после образования сгустка. Внутренний фибринолиз происходит в естественных условиях и процесс распада идет изнутри сгустка или тромба, тогда как внешний фибринолиз происходит при терапевтическом тромболлизисе, когда активатор плазминогена вводится в кровоток и растворение тромба начинается снаружи. Поскольку в данной работе активатор плазминогена добавлялся в плазму изначально, до активации свертывания, это типичный пример внутреннего фибринолиза. Почему же автор считает, что его экспериментальная модель воспроизводит лишь тромболитическую терапию, на фоне которой образуется сгусток? Почему данная модель не может отражать тромбообразование, сопровождающееся естественным реактивным фибринолизом? Активированные эндотелиоциты могут одновременно экспрессировать тканевой фактор и секретировать активатор плазминогена, создавая его высокую локальную концентрацию. Интерпретация модели, которой придерживается автор, на мой взгляд, не полная и сужает потенциальное значение исследования и ограничивает применимость его результатов.*

- *Часть опытов была проведена в плазме, которая контактировала с поверхностью, покрытой фибробластами, которые, по-видимому, использовались как аналог эндотелиоцитов, экспрессирующих тканевой фактор. Если это так, то такая модель требует более детального обоснования, в частности, характеристики уровня экспрессии и поверхностной плотности тканевого фактора на фибробластах.*

- *Раздел 3.7 «Скорости фибринолитических реакций оказывают незначительное влияние на скорость пространственного лизиса» содержит исключительно результаты математического моделирования. Оказалось, что скорость пространственного лизиса, по данным расчетов, не зависит от кинетики*

активации плазминогена, расщепления фибрина, связывание плазмина с фибрином, ингибирования плазмина и связывания плазминогена с фибрином. Это вывод неожиданный и парадоксальный и требует экспериментального подтверждения в условиях, когда названные параметры искусственно варьируются. Методические возможности для этого существуют.

- Раздел 3.9 посвящен доказательству прямого активирующего действия плазмина на фактор IX. По этому разделу есть, как минимум, два существенных комментария. Во-первых, проведенные эксперименты с очищенным фактором IX можно считать сугубо предварительными, поскольку в них отсутствует кинетика процесса, не определены K_m и субстратная специфичность. Во-вторых, расщепление фактора IX под действием плазмина хорошо известно (например, Osterud et al., *Thromb Diath Haemorrh.* 1975;33:553 и Samis et al., *Blood.* 2000;95:943-951). Показано, что плазмин сначала активирует фактор IX, расщепляя связи, образованные Arg145 и Arg180, а потом инактивирует его путем расщепления трех дополнительных пептидных связей. В чем именно состоят новизна полученных результатов?

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

Диссертационная работа обладает научной новизной, а именно: впервые разработана экспериментальная модель для изучения одновременного формирования и растворения фибринового сгустка в реальном масштабе времени. В дополнение к экспериментальному подходу, автором разработана теоретическая модель направленного фибринолиза. Сочетание двух методических подходов позволило установить новые и важные научные факты, характеризующие пространственные взаимоотношения между свертыванием крови и фибринолизом. Изучена зависимость типов «волнообразного» фибринолиза от концентрации активатора плазминогена. Показано замедление лизиса фибрина, вплоть до его остановки, вызванное истощением свободного плазминогена при высоких концентрациях активатора плазминогена.

Практическая значимость результатов работы определяется клинической важностью проблем гемостаза и тромбоза, которые, несмотря на успехи последних десятилетий, остаются одной из самых больших социальных и медицинских проблем в мире. Результаты работы открывают перспективы создания новых тестов для оценки

состояния фибринолиза, а также могут играть важную роль при разработке новых методов и средств тромболитической терапии.

Положения, выносимые на защиту, отражают главное содержание работы. Автореферат полностью раскрывает содержание диссертации. Основные результаты диссертации опубликованы в 8 научных работах, включая 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, что отвечает формальным требованиям ВАК.

Заключение. Диссертационная работа А. С. Жалялова «Исследование пространственной динамики роста и лизиса фибринового сгустка в условиях тромболитической терапии» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для биологии и медицины. Рецензируемая диссертация отвечает требованиям п.9 «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 02 августа 2016 г. № 748), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор А. С. Жалялов заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Главный научный сотрудник НИЛ «Белково-клеточные взаимодействия»
Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего
профессионального образования Казанский федеральный университет,
доктор медицинских наук,
профессор

Рустем Игоревич Литвинов

Адрес: 420012 Казань, ул. Карла Маркса, д.76
Телефон: +7-917-885-9787
E-mail: rustempa@gmail.com

Зодиясь, ДМ Митовичева зодермо

**ВЕДУЩИЙ
ДОКУМЕНТОВЕД**



28.05.2019 г.