

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.228.03
(Д 003.075.04), СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КРАСНОЯРСКИЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» (ФИЦ КНЦ СО РАН, КНЦ СО РАН),
МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 30.01.2024 № 1

О присуждении Литвиненко Алёне Леонидовне, гражданке Российской Федерации, учёной степени кандидата физико-математических наук.

Диссертация «Количественное описание популяции тромбоцитов в нативном состоянии и под воздействием агониста активации» по специальности 1.5.2. Биофизика принята к защите 17.11.2023 (протокол заседания № 11) диссертационным советом 24.1.228.03 (Д 003.075.04), созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН, КНЦ СО РАН), Министерство науки и высшего образования РФ, 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, д. 50, создан приказом Минобрнауки № 21/нк от 24.01.2017.

Соискатель Литвиненко Алёна Леонидовна 12.02.1993 года рождения. В 2015 году соискатель окончила бакалавриат Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (Новосибирский государственный университет, НГУ),

Министерство образования и науки РФ, по направлению подготовки 03.03.02 Физика, присуждена квалификация Бакалавр; в 2017 окончила очную магистратуру Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (Новосибирский государственный университет, НГУ), Министерство образования и науки РФ, по направлению подготовки 03.04.02 Физика, присуждена квалификация Магистр; в 2021 году окончила очную аспирантуру Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (Новосибирский государственный университет, НГУ), Министерство науки и высшего образования РФ, по направлению подготовки 03.06.01 Физика и астрономия, присуждена квалификация «Исследователь. Преподаватель-исследователь», работает младшим научным сотрудником в лаборатории цитометрии и биокинетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН), Министерство науки и высшего образования РФ.

Диссертация 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 (ИХКГ СО РАН), Министерство науки и высшего образования РФ.

Научный руководитель – доктор физико-математических наук, профессор Мальцев Валерий Павлович, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН), лаборатория цитометрии и биокинетики, заведующий лабораторией.

Официальные оппоненты:

Сироткина Ольга Васильевна, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации («НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России), факультет биомедицинских наук, декан, кафедра лабораторной медицины с клиникой Института медицинского образования, профессор;

Зырянов Виктор Яковлевич, доктор физико-математических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Институт физики им. Л.В. Киренского Сибирского отделения Российской академии наук (ИФ СО РАН) – обособленное подразделение, руководитель научного направления дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН), г. Санкт-Петербург, в своем положительном отзыве, подписанном Миндукшевым Игорем Викторовичем, доктор биологических наук, лаборатория «Клеточные механизмы гомеостаза крови», заведующий лабораторией, главный научный сотрудник, указала, что диссертация соискателя содержит решение задачи определения субпопуляционного распределения тромбоцитов методом сканирующей проточной цитометрии, что имеет существенное значение для разработки оперативного метода клинической диагностики тромбоцитарного звена гемостаза и оценки функционального статуса тромбоцитов, и соответствует требованиям пунктов 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

Соискатель имеет 21 опубликованную работу, в том числе по теме диссертации опубликована 21 работа, из них в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы цитирований Scopus, Web of Science, опубликовано 6 работ, в рецензируемом научном издании, входящем в РИНЦ опубликована 1 работа, а также 14 публикаций в сборниках докладов научных конференций. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, объем научных изданий (статей) составляет 62 стр., авторский вклад – 80%.

Наиболее значимые публикации:

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. V. 23 (10), 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. V. 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. V. 135, 106700.
4. Moskalensky A.E. The platelet shape change: biophysical basis and physiological consequences / Moskalensky A.E., Litvinenko A.L. // *Platelets*, 2019. V. 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. V. 14 (3), 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. V. 89 (11), P.1010–1016.

На диссертацию и автореферат поступило 5 отзывов. Все отзывы положительные. Отзывы: доктора физико-математических наук, профессора Хлебцова Н.Г., заведующего лабораторией нанобиотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН); доктора биологических наук, профессора Локтева В.Б., заведующего лабораторией иммунологии вирусов, главного научного сотрудника Федерального бюджетного учреждения науки Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора); кандидата физико-математических наук Москаленского А.Е., заведующего лабораторией оптики и динамики биологических систем Физического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ); доктора медицинских наук, профессора Карпенко А.А., заведующего научно-исследовательским отделом сосудистой и гибридной хирургии Института патологии кровообращения, врача-сердечно-сосудистого хирурга Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ («НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России); доктора медицинских наук, профессора Стурова В.Г., профессора кафедры клинической биохимии Института медицины и психологии В. Зельмана

Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ) замечаний не содержат.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается компетентностью и высокой квалификацией специалистов в области анализа клеток крови, оптики и биофотоники, а также соответствием основных направлений исследований задачам диссертационной работы Литвиненко А.Л. Исследовательский коллектив лаборатории «Клеточные механизмы гомеостаза крови» ИЭФБ РАН занимается исследованием внутриклеточной и межклеточной сигнализации клеток крови, нарушением функций тромбоцитов при воспалительных процессах, развитием новых технологий клеточного анализа на основе метода малоуглового светорассеяния, и имеет высокую квалификацию по теме диссертации, что подтверждается научными публикациями. Доктор физико-математических наук, профессор Зырянов В.Я. (г. Красноярск) является специалистом в области исследования мультислойных фотонных структур с управляемыми оптическими характеристиками, в частности решением обратных задач светорассеяния, тем самым область его компетенции существенно перекликается с 3 главой диссертации Литвиненко А.Л. Доктор биологических наук, доцент Сироткина О.В. (г. Санкт-Петербург) является деканом факультета биомедицинских наук и профессором кафедры лабораторной медицины с клиникой, её публикации связаны с цитометрией тромбоцитов, в том числе с исследованием спонтанной активации, и исследованием тромбоцитарных микровезикул, как маркеров степени развития различных заболеваний, что также в значительной степени перекликается с основной тематикой работы Литвиненко А.Л.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработан новый научный подход для исследования популяции тромбоцитов, позволяющий выявить закономерности распределения нативных и активированных тромбоцитов по форме;

предложена оригинальная научная гипотеза о взаимосвязи процессов изменения формы одиночных тромбоцитов с появлением частично активированной субпопуляции тромбоцитов;

введены новые параметры, характеризующие нативную популяцию тромбоцитов и эффективность её активации под воздействием агониста;

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано, что по индексу формы тромбоциты распределяются на три субпопуляции;

применительно к проблематике диссертации результативно использован метод сканирующей проточной цитометрии, обеспечивающий высокую точность определения морфологических и структурных параметров клеток крови;

изложена феноменологическая модель активации тромбоцитов;

раскрыт механизм появления частично активированной субпопуляции тромбоцитов;

изучено влияние выбора оптической модели тромбоцита на определяемые параметры формы при решении обратной задачи светорассеяния;

проведена модернизация оптической модели тромбоцита, введён параметр – индекс формы;

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработан и успешно апробирован протокол определения формы тромбоцитов на сканирующем проточном цитометре, предотвращающий спонтанную активацию пробы;

определены средние значения мод субпопуляций нативных тромбоцитов для условно здоровых доноров и параметры чувствительности популяции тромбоцитов к агонисту активации;

представлено впервые определённое значение скачка индекса формы, необходимого для начала изменения формы тромбоцитов условно здоровых доноров под воздействием аденозиндифосфата;

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ использован сканирующий проточный цитометр, достоверность полученных данных подтверждается их воспроизводимостью в серии экспериментов и статистической обработкой;

теория активации популяции тромбоцитов построена на известных, проверяемых данных изменения формы и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по процессу активации тромбоцитов;

идея базируется на обобщении передового опыта мирового сообщества в области исследования процессов, приводящих к активации тромбоцитов;

использованы сравнения полученных данных с предложенными автором теоретическими моделями процесса активации популяции тромбоцитов;

установлено качественное соответствие полученных результатов изменения чувствительности тромбоцитов к агонисту активации в условиях применения антитромбоцитарной терапии с общепринятыми представлениями её воздействия на тромбоциты;

использованы современные методики сбора и обработки исходной информации с помощью сканирующей проточной цитометрии;

Личный вклад соискателя состоит в: постановке цели и задач исследования, выборе методов расчёта теоретических моделей формы, планировании и проведении экспериментов, отработке этапов пробоподготовки, описании экспериментальных распределений тромбоцитов по форме, разработке модели процесса активации, проведении расчетов с последующим анализом и интерпретацией результатов, апробации результатов исследования на научных конференциях и подготовке публикаций.

В ходе защиты диссертации не было высказано критических замечаний, относящихся к сути диссертации, однако был задан ряд вопросов: каким

методом получены распределения; на каком основании для чувствительности использовалось логнормальное распределение; что нового и неожиданного в том, что приближение тромбоцитов в активированном состоянии приводит к смещению индекса формы; была ли сделана попытка объяснить появление трёх субпопуляций тромбоцитов; совпали ли распределения по форме, измеренные на разных длинах волн; существует ли смещение индекса формы для других клеток крови; были ли проведены измерения распределений тромбоцитов на микроскопе; насколько значимы цифры, приведённые в положениях 2 и 3; получатся ли для других доноров такие же значения; что такое параметр $AD\Phi_{эф}$, как он проявляет себя на графиках, в чем его биологический смысл; чем объясняется слабое воздействие клопидогрела на тромбоциты; каким образом ваш эксперимент соответствует нативному состоянию тромбоцитов в кровеносном русле; исследовались ли кем-то индикатрисы светорассеяния тромбоцитов в модельных сосудах; кто подразумевается под условно здоровыми донорами, как оценивались параметры, способные повлиять на состояние тромбоцитов у этих лиц; почему взято такое количество доноров; каким образом можно судить об активации тромбоцитов по результатам проточной цитометрии, если кульминацией активации считать адгезию; как учитывались параметры лазерного излучения (поляризация, когерентность и монохроматичность) в модели.

Соискатель Литвиненко А.Л. согласилась с замечаниями и ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы, в частности: для каждого тромбоцита получена индикатриса светорассеяния, решена обратная задача светорассеяния, по решениям построена гистограмма; основной эффекторной молекулой в тромбоците является Ca^{2+} , концентрация которой связывается с объёмом клеток, а объём тромбоцитов в популяции распределён логнормально; неожиданным было, то на сколько будет смещение индекса формы и для какой именно длины волны; объяснение появления трёх субпопуляций представлено в описании феноменологической модели, средней субпопуляции соответствуют тромбоциты, для которых воздействие

превысило порог, но недостаточно для перевода в полностью активированное состояние; для меньшей длины волны происходит смещение индекса формы в меньшие значения; ранее проводилось измерение формы эритроцитов, изменение распределения по форме не наблюдалось из-за особенностей формы эритроцитов; сравнение сканирующей проточной цитометрии и микроскопии не является возможным: сканирующая проточная цитометрия имеет значительно более высокую чувствительность, тромбоциты обладают малым показателем преломления, близким к воде, и вращаются на стекле, что затрудняет определение сплюснутости клетки; цифры приведены с указанием размера выборки и метода расчёта, количество значимых знаков соответствует правилам представления погрешности измерения; нет, данные значения нельзя использовать как референсный интервал для других доноров; АДФ_{эф} моделирует качество подготовки пробы, в графиках проявляет себя как соотношение неактивированной и полностью активированной субпопуляции; клопидогрел является ингибитором не основного рецептора к АДФ; в данной работе под нативным состоянием подразумеваются тромбоциты, на которые не происходит контролируемое внешнее воздействие агониста активации, состояние тромбоцитов в вене вводится в модели отдельно; нет, на данный момент индикатрису светорассеяния в предложенном угловом диапазоне способны получить только в лаборатории цитометрии и биокинетики; под условно здоровыми донорами подразумевалась группа лиц от 20 до 60 лет, не курящих, не принимающих препараты, влияющие на состояние системы гемостаза, и антидепрессанты, не имевших инфекционных заболеваний в течение двух недель до забора крови, индекс массы тела и липидный спектр не оценивались; количество доноров обусловлено сложностью технологии измерения; процесс активации тромбоцитов не всегда связан с адгезией, три признака активации (изменение формы, появление специфических рецепторов и экспрессия гранул) возможно измерить на одиночных клетках; эти параметры учтены при создании сканирующего проточного цитометра.

На заседании **30 января 2024 года** диссертационный совет принял решение: за решение научной задачи математического описания популяции тромбоцитов, как в нативном состоянии, так и в процессе активации, имеющей существенное значение для развития лабораторной диагностики тромбоцитарного звена гемостаза, присудить **Литвиненко А.Л.** ученую степень кандидата физико-математических наук.

При проведении тайного голосования с использованием информационно-коммуникационных технологий диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 6 докторов наук по специальности 1.5.2. Биофизика отрасли физико-математические науки, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – **18**, против – **0**.

Заместитель председателя
диссертационного совета,
д.б.н., с.н.с.



Болсуновский Александр Яковлевич

Учёный секретарь
диссертационного совета,
к.б.н.



Дементьев Дмитрий Владимирович

01.02.2024