

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора, заслуженного деятеля науки РФ Долгих Владимира Терентьевича на диссертацию Будника Ивана Александровича на тему «Механизмы нарушений гемостатического потенциала крови и пути его коррекции при геморрагических состояниях», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология

Актуальность исследования

Воздействие на организм таких экстремальных факторов, как острая кровопотеря, гипоксия, ионизирующее излучение, токсины возбудителей особо опасных инфекций, нарушает функционирование практически всех систем организма, обеспечивающих гомеостаз. Выраженные нарушения возникают в системе гемостаза – функциональной физиологической системе, обеспечивающей гемостатический потенциал крови, необходимый для циркуляции крови в сосудистом русле и остановки кровотечения при повреждении сосудов.

Актуальность темы исследования не вызывает сомнений, поскольку нарушения гемостатического потенциала крови – это один из ведущих патогенетических факторов возникновения трудно контролируемых, а порой и фатальных кровотечений. В этих условиях экстренная коррекция гемостатического потенциала крови представляет достаточно большую сложность. Почему? Обычно с этой целью проводится переливание компонентов аллогенной крови в фиксированном соотношении доз, а это имеет ограниченную клиническую эффективность, поскольку не позволяет повысить концентрацию факторов свертывания в плазме пациента до необходимого уровня и достичь необходимого гемостатического потенциала. Именно поэтому в настоящее время интенсивно разрабатываются алгоритмы целенаправленной гемостатической терапии, основанные на применении концентратов факторов свертывания, однако эффективность этих препаратов показана не во всех исследованиях, что объясняется недостаточной изученностью их эффектов при различных формах патологии системы гемостаза. Поэтому диссертация И. А. Будника, в которой он исследует механизмы нарушений в системе гемостаза при состояниях высокого геморрагического риска и обосновывает новые подходы к коррекции гемостатического потенциала крови с помощью гемостатических препаратов, является актуальным исследованием, имеющим большую практическую значимость.

В этой связи представляется актуальным и заслуживает всяческого одобрения попытка Ивана Александровича изучить молекулярно-клеточные механизмы нарушений

гемостатического потенциала крови при состояниях высокого геморрагического риска и обосновывать с патогенетических позиций новые подходы к коррекции гемостатического потенциала крови с помощью гемостатических препаратов, что представляется весьма важным не только для фундаментальной медицины, но и для практики здравоохранения.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа И. А. Будника выполнена с использованием разнообразных современных методов исследования системы гемостаза, включая ротационную тромбоэластометрию, тест генерации тромбина, агрегометрию, метод оценки адгезии и агрегации тромбоцитов при высокой скорости сдвига, а также ряда биохимических методов для оценки связи интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с фибриногеном и цитоскелетом тромбоцитов.

Научные положения, выносимые автором на защиту, четко сформулированы и отражают наиболее значимые закономерности, установленные при выполнении диссертационного исследования. Сформулированная диссертантом цель исследования достигнута решением соответствующих ей задач, что полностью отражено в выводах диссертации. Практические рекомендации логически следуют из полученных автором результатов. Все это хорошо согласуется с современными научными данными и представлениями по исследуемой автором теме. Вышеизложенное позволяет считать сформулированные в диссертационной работе научные положения, выводы и рекомендации достаточно обоснованными.

Степень достоверности результатов исследования

Высокая достоверность результатов и обоснованность выводов исследования обеспечена использованием в работе современных методов исследования, адекватных цели и задачам; использованием сертифицированных реактивов и оборудования; тщательным планированием каждого эксперимента, при необходимости с участием соответствующих специалистов; использованием методов статистического анализа, соответствующих дизайну конкретного эксперимента; непротиворечивостью полученных результатов и их сопоставимостью с результатами других авторов; обсуждением результатов исследования на международных и Российских научных конференциях; публикацией результатов исследования в ведущих рецензируемых научных журналах.

Научная новизна результатов исследования

Грамотное с патогенетических позиций моделирование геморрагических состояний и не менее грамотное использование различных препаратов для коррекции нарушений гемостатического потенциала крови позволило диссертанту получить новые научные факты, что выразилось в следующем:

- *во-первых*, Иваном Александровичем установлен вклад гемодилуции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза в нарушение гемостатического потенциала крови и показано, что его коррекция может быть достигнута путем комбинированного применения гемостатических препаратов даже в субэффективных концентрациях, не вызывающих эффекта при их использовании по отдельности;

- *во-вторых*, выявлены наиболее эффективные комбинации концентратов факторов свертывания и антифибринолитиков, позволяющие достигать максимальной коррекции гемостатического потенциала крови в зависимости от наличия и выраженности гемодилуции, уровня и механизма индукции фибринолитической активности, наличия качественных и количественных дефектов тромбоцитарного звена системы гемостаза;

- *в-третьих*, диссертантом создана оригинальная модель изолированной тромбоцитопении *in vitro*, на основе которой разработан способ оценки адгезивной и агрегационной функции тромбоцитов и их участия в формировании кровяного сгустка в условиях тромбоцитопении различной тяжести;

- *в-четвертых*, им выделены три категории пациентов с тромбастенией Гланцмана, отличающиеся по степени коррекции генерации тромбина при использовании концентрата рекомбинантного активированного фактора VII *ex vivo*.

- *в-пятых*, создана оригинальная модель тромбастении Гланцмана *in vitro*, на основе которой разработан принципиально новый подход к коррекции формирования кровяного сгустка при тромбастении Гланцмана, заключающийся в стимуляции прокоагулянтной активности тромбоцитов через рецепторы, сопряженные с G-белком, в частности через рецепторы тромбина (PAR-1 и PAR-4), АДФ (P2Y₁ и P2Y₁₂) и тромбоксана A₂ (TP);

- *и последнее*, И.А. Будником установлено, что механизм угнетения функций тромбоцитов при использовании ацетилсалициловой кислоты и антагониста рецепторов P2Y₁₂, используемых для проведения двойной антитромбоцитарной терапии, а также антагониста рецептора P2Y₁₂ включает нарушение формирования в тромбоцитах комплекса «фибриноген–интегрин α IIb β 3–цитоскелет».

Значимость для науки и практики полученных результатов

Полученные И. А. Будником результаты, безусловно, имеют большое значение для науки и практики. Его фундаментальные исследования позволяют констатировать, что

коррекция гемостатического потенциала крови при гемодилуции и гиперфибринолизе может быть достигнута путем комбинированного применения гемостатиков с разным механизмом действия даже в субэффективных концентрациях. Убежден, что применение такого подхода в клинической практике позволит повысить эффективность гемостатической терапии при травматической коагулопатии без существенного увеличения риска тромботических осложнений.

Важное научно-практическое значение имеет развиваемая диссертантом концепция о том, что эффективность той или иной комбинации гемостатических средств во многом зависит от наличия и степени гемодилуции, гиперфибринолиза и механизма его индукции (вида действующего активатора плазминогена), наличия качественных и количественных дефектов тромбоцитарного звена системы гемостаза, а это обосновывает необходимость дифференцированного применения гемостатических средств в зависимости от конкретного сочетания указанных патогенетических факторов.

Не менее важное научно-практическое значение имеет разработанный диссертантом метод оценки адгезивной и агрегационной функции тромбоцитов с учетом содержания тромбоцитов в исследуемом образце крови. Благодаря своей простоте и чувствительности, этот метод может быть применен в клинической практике для оценки функций тромбоцитов при тромбоцитопении различного генеза, что, безусловно, повышает точность оценки геморрагического риска при этих формах патологии.

Результаты его исследования проливают свет еще на одну недостаточно исследованную проблему – патогенетическое обоснование возможности корректировать генерацию тромбина при тромбастении Гланцмана с помощью концентрата рекомбинантного активированного фактора VII. Показано, что коррекция формирования кровяного сгустка при тромбастении Гланцмана достигается путем стимуляции прокоагулянтной активности тромбоцитов через рецепторы, сопряженных с G-белком, что расширяет представления о роли этих рецепторов и интегринов $\alpha IIb\beta 3$ в регуляции данной функции тромбоцитов и открывает новое патогенетически обоснованное направление гемостатической терапии.

И последнее, диссертантом получены новые знания о закономерностях формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет» в динамике агрегации тромбоцитов и влиянии на этот процесс ингибиторов функций тромбоцитов. Вероятно, что анализ формирования этого комплекса в динамике агрегации тромбоцитов может стать основой для разработки нового метода оценки остаточной реактивности тромбоцитов для персонализированного подбора дозы и вида антитромбоцитарных препаратов.

Результаты диссертационного исследования И. А. Будника внедрены в учебный процесс кафедры патофизиологии и кафедры патологии человека Института клинической медицины и кафедры патологии Института фармации ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), а также в учебный процесс и научную работу кафедры патологической физиологии им. акад. А. А. Богомольца и научную работу Центра коллективного пользования НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России.

Публикации по теме диссертации

По теме представленной диссертации опубликованы 16 статей, в том числе 4 – в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, утвержденный Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, и 12 — в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus и/или Web of Science.

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертационная работа И.А. Будника написана в классическом стиле, изложена на 325 страницах и состоит из введения, обзора литературы, главы с изложением материалов и методов исследования, четырех глав, содержащих результаты собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Результаты исследований проиллюстрированы качественно выполненными 55 рисунками и 8 таблицами, что значительно дополняет и облегчает восприятие описанных результатов. Список литературы включает 398 источников, что свидетельствует о тщательном изучении исследований других авторов в данной научной области.

Во «Введении» приведено обоснование актуальности и степень разработанности темы исследования, четко сформулированы его цель и задачи, методология исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, четко изложены положения, выносимые на защиту.

В главе 1 представлен «Обзор литературы», который посвящен анализу механизмов нарушения гемостатического потенциала крови при травматической коагулопатии, первичной иммунной тромбоцитопении, тромбастении Гланцмана и приеме антитромбоцитарных препаратов, а также современных принципах экстренной коррекции гемостатического потенциала крови при этих формах патологии.

Глава 2 посвящена описанию материалов и методов исследования. Объектом исследования послужила кровь, полученная от 256 здоровых добровольцев-доноров (145 мужчин и 111 женщин в возрасте от 20 до 60 лет), 12 пациентов с первичной иммунной тромбоцитопенией (4 мужчин и 8 женщин в возрасте от 21 до 52 лет), 24 пациента с тромбастенией Гланцмана (11 мужчин и 13 женщин в возрасте от 21 до 50 лет), находившихся под наблюдением в отделении гематологии Медицинского центра имени Х. Шиба (Тель-ха-Шомер, Израиль). В работе четко обозначены критерии включения, невключения и исключения из исследования.

Углубленному исследованию автор подвергал обогащенную и бедную тромбоцитами плазму, а также плазму без клеточных микрочастиц, оценивал процессы формирования и лизиса сгустка цитратной крови, используя ротационный тромбоэластомер. Генерацию тромбина докторант изучал в обогащенной тромбоцитами плазме, а адгезию и агрегацию тромбоцитов при высокой скорости сдвига с помощью анализатора Impact-R. Кроме того, с помощью агрегометра AggRAM исследовал агрегацию тромбоцитов, используя 9 различных ингибиторов и активаторов тромбоцитов. Для выявления стабильности связи между интегринами $\alpha\text{IIb}\beta_3$ и фибриногеном в динамике агрегации тромбоцитов в обогащенной тромбоцитами плазме оценивали скорость эпифибриноген-индуцированной дезагрегации, а для оценки ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$ с цитоскелетом тромбоцитов белки цитоскелетной фракции разделяли методом электрофореза и анализировали с помощью вестерн-блоттинга.

Диссертантом использовано несколько экспериментальных моделей геморрагических состояний (точнее стендовых исследований) *in vitro*:

- модель травматической коагулопатии *in vitro*, используя гемодилюцию, гиперфибринолиз, гипотермию и ацидоз;
- модель изолированной тромбоцитопении *in vitro* путем разделения цельной крови на эритроцитарную массу, обогащенную тромбоцитами плазму и бестромбоцитарную плазму;
- модель тромбастении Гланцмана *in vitro*.

В главах 3–6 представлены результаты собственных исследования диссертанта, отражающие решение поставленных им задач. Решение задач выполнялось два этапа. На *первом этапе*, используя современные методы оценки функционально-метаболического состояния сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного звеньев системы гемостаза, провел фундаментальные исследования, позволившие:

- *во-первых*, оценить вклад гемодилюции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза, как важнейших патогенетических факторов острой кровопотери, в нарушение

формирования кровяного сгустка;

- *во-вторых*, разработать критерии оценки адгезивной и агрегационной функции тромбоцитов и формирования кровяного сгустка в зависимости от содержания тромбоцитов в крови;

- *в-третьих*, изучить генерацию тромбина у пациентов с тромбастенией Гланцмана и обосновать персонализированный подход к ее коррекции;

- *в-четвертых*, разработать критерии оценки адгезивной и агрегационной функции тромбоцитов и формирования кровяного сгустка в зависимости от содержания тромбоцитов в крови.

На *втором этапе* после выявления важнейших патогенетических факторов гемостатических нарушений при острой кровопотере, Иван Александрович попытался оценить возможность коррекции этих нарушений путем комбинированного применения гемостатических препаратов с учетом уровня их фибринолитической активности, провести анализ эффектов различных гемостатических препаратов на формирование кровяного сгустка в условиях гиперфибринолиза, индуцированного тканевым или урокиназным активатором плазминогена. Кроме того, диссертант исследовал возможность коррекции гемостатического потенциала крови в модели изолированной тромбоцитопении *in vitro* с помощью концентратов факторов свертывания с учетом содержания тромбоцитов в крови и уровня ее фибринолитической активности. И, наконец, последнее – он выявил влияние ингибиторов функций тромбоцитов на формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ –цитоскелет». Полученные результаты он использовал для констатации механизма развития геморрагических осложнений при использовании антитромбоцитарных препаратов, что имеет исключительно важное значение для практического здравоохранения.

Для исследования возможности коррекции гемостатического потенциала крови диссертант использовал 8 различных гемостатических препаратов: транексамовую кислоту, концентрат фибриногена, концентрат фактора фон Виллебранда, концентрат фактора XIII, концентрат рекомбинантного активированного фактора VII, активированный концентрат протромбинового комплекса, растворы фибриногена, ингибитор фибринолиза.

В заключении диссертации автор дает подробный анализ и обобщение полученных результатов, формулирует выявленные закономерности нарушения гемостатического потенциала крови и разработанные принципы его коррекции при исследованных состояниях высокого геморрагического риска.

Выводы и практические рекомендации логичны и обоснованы полученными результатами. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

При знакомстве с диссертацией возникло несколько вопросов, которые я озвучиваю с целью научной дискуссии по диссертации Ивана Александровича Будника:

1. Как Вы считаете, за счет чего осуществляется преждевременная терминация синтеза или изменение первичной структуры белковой части субъединиц интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$, что, как известно, может приводить к нарушению их процессинга в комплексе Гольджи мегакариоцитов и быстрой протеасомной деградации?

2. Какие препараты в отдельности или в комплексе оказались самыми оптимальными при коррекции нарушенного гемостатического потенциала крови при геморрагических состояниях?

3. Почему при выборе дозы транексамовой кислоты необходимо учитывать не только уровень фибринолитической активности, но и концентрацию фибриногена в плазме крови?

4. Почему Вы считаете, что в условиях тромбоцитопении для коррекции формирования кровяного сгустка при отсутствии гиперфибринолиза целесообразно использование только концентрата фибриногена, а при гиперфибринолизе - концентрат фибриногена в комбинации с активированным концентратом протромбинового комплекса?

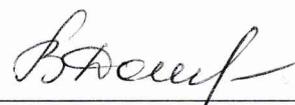
5. Что Вы понимаете под субэффективными концентрациями гемостатических препаратов и как Вы их определяли?

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Будника Ивана Александровича «Механизмы нарушений гемостатического потенциала крови и пути его коррекции при геморрагических состояниях», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной проблемы – установление механизмов нарушения гемостатического потенциала при геморрагических состояниях и разработка новых патогенетически обоснованных подходов к его коррекции с помощью современных гемостатических средств, что имеет большое значение для патологической физиологии как фундаментальной науки. Диссертация И.А. Будника соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (с изменениями,

утвержденными Постановлением Правительства Российской Федерации № 1168 от 01.10.2018 в редакции от 31.08.2019), а ее автор, Будник Иван Александрович, заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Официальный оппонент
заведующий кафедрой общей патологии
Института высшего и дополнительного
профессионального образования
ФГБНУ «Федеральный научно-клинический
центр реаниматологии и реабилитологии»
доктор медицинских наук
(14.03.03 – патологическая физиология),
профессор, заслуженный деятель науки РФ
Долгих Владимир Терентьевич
e-mail: prof_dolgih@mail.ru.
Тел. 8(916)084-26-21



14 февраля 2020 г.

Подпись доктора медицинских наук,
профессора В. Т. Долгих «Заверяю»,
заместитель Руководителя НИИ общей реаниматологии
им. В.А. Неговского ФГБНУ «Федеральный научно-
клинический центр реаниматологии и реабилитологии»
Попов Валерий Владимирович



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии» (ФНКЦ РР), 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2; тел. 8 (495) 694-27-08, niior@fnkrr.ru, <https://fnkrr.ru>