

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научно-исследовательской
работе ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И. М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)
кандидат медицинских наук
Бутнару Д. В.

« 14 » *ноября* 20 *19* г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский
университет имени И. М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)**

Диссертация Будника Ивана Александровича на тему «Механизмы нарушений гемостатического потенциала крови и пути его коррекции при геморрагических состояниях» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.03 – Патологическая физиология выполнена на кафедре патофизиологии Института клинической медицины.

В период подготовки диссертации соискатель И. А. Будник работал в ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) на кафедре патофизиологии Института клинической медицины в должности доцента с 2013 г. по настоящее время.

В 2006 г. окончил государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» по специальности «Лечебное дело»

Диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук на тему «Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на адгезию и

агрегацию тромбоцитов при различных скоростных параметрах движения крови и при изменении рН» И. А. Будник защитил в 2007 г. в диссертационном совете Д 208.094.03, созданном на базе государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Саратовский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию».

Научный консультант — Морозова Ольга Леонидовна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры патофизиологии Института клинической медицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность темы исследования

Актуальность темы диссертационного исследования И. А. Будника обусловлена тем, что нарушения в различных звеньях системы гемостаза создают угрозу тяжелых геморрагических осложнений при травмах, хирургических и других инвазивных вмешательствах, родах. Летальность при острой массивной кровопотере достигает 40 % без заметной тенденции к снижению за последние годы. Ежегодно от острой массивной кровопотери в мире погибают около 1,9 млн человек. При этом возможности экстренной коррекции гемостатического потенциала крови ограничены и сводятся главным образом к переливанию компонентов крови и криопреципитата. Однако применение этих средств имеет невысокую эффективность и сопряжено с риском анафилаксии, передачи инфекций, циркуляторной перегрузки, острого повреждения легких и других осложнений. В связи с этим в последние годы для купирования тяжелых кровотечений все чаще используют различные фармацевтические гемостатики системного действия, включая антифибринолитики и концентраты факторов свертывания. Несмотря на существенные преиму-

щества перед компонентной гемостатической терапией и значительный объем исследований, посвященных разработке алгоритмов применения этих препаратов, достичь с их помощью желаемого результата удастся далеко не всегда. Последнее во многом объясняется недостаточной изученностью влияния гемостатических препаратов на систему гемостаза и их взаимодействия между собой при различных геморрагических состояниях. Кроме того, многие вопросы патогенеза и оценки степени расстройств гемостатического потенциала крови при этих состояниях также остаются открытыми. В связи с этим диссертационное исследование И. А. Будника, в котором он исследует механизмы нарушений в системе гемостаза при различных состояниях повышенного геморрагического риска, включая травматическую и гемодилюционную коагулопатию, гиперфибринолиз, количественные и качественные дефекты тромбоцитарного звена системы гемостаза, и обосновывает новые подходы к оценке и коррекции гемостатического потенциала крови с использованием гемостатиков системного действия, несомненно, представляется актуальным и ценным как с позиции фундаментальной науки, так и практической медицины.

Научная новизна

Впервые в условиях гемодилюции установлен относительный вклад гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза в нарушение гемостатического потенциала крови и показано, что коррекция выявленных нарушений обеспечивается путем комбинированного применения гемостатических препаратов в субэффективных концентрациях. Впервые сформулированы принципы коррекции гемостатического потенциала крови в зависимости от степени гемодилюции, уровня и механизмов индукции фибринолитической активности, степени снижения содержания тромбоцитов и нарушения их функциональной активности. При этом выявлены наиболее эффективные комбинации гемостатических препаратов, позволяющие достигать максимального результата в зависимости от конкретного сочетания вышеуказанных патогенетических факторов.

Впервые разработана модель изолированной тромбоцитопении *in vitro*, предусматривающая возможность контроля содержания тромбоцитов в образце крови. С помощью этой модели определены критерии оценки адгезивной и агрегационной функции тромбоцитов, а также формирования кровяного сгустка в условиях тромбоцитопении различной тяжести. Применение этих критериев у пациентов с первичной иммунной тромбоцитопенией позволило установить, что снижение гемостатического потенциала крови при данной патологии обусловлено именно снижением содержания тромбоцитов при сохранении их нормальной функциональной активности.

Впервые разработана модель тромбастении Гланцмана *in vitro*, с помощью которой установлено, что коррекция формирования кровяного сгустка достигается путем стимуляции прокоагулянтной активности тромбоцитов через рецепторы, сопряженные с гетеротримерным G-белком, в частности через рецепторы тромбина (PAR-1 и PAR-4), АДФ (P2Y₁ и P2Y₁₂) и тромбоксана A₂ (TP). Впервые установлено, что в зависимости от степени коррекции генерации тромбина с помощью концентрата рекомбинантного активированного фактора VII *ex vivo* пациенты с тромбастенией Гланцмана могут быть разделены на три категории: пациенты с «сильным», «средним» и «слабым» ответом.

Впервые выявлены закономерности формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» в динамике агрегации тромбоцитов, при этом показана роль сигнализации от рецепторов, сопряженных с гетеротримерным G-белком, активации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ «изнутри наружу», физического соединения тромбоцитов друг с другом через фибриноген, сигнализации от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ «снаружи внутрь» и полимеризации β -актина. Впервые показано, что механизм угнетения функций тромбоцитов при использовании ацетилсалициловой кислоты и антагонистов рецепторов P2Y₁ и P2Y₁₂ включает нарушение формирования указанного комплекса.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты, полученные И. А. Будником в диссертационной работе, имеют большое значение для науки и практики. Проведенное исследование расширяет представления о роли гемодилуции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза в нарушении гемостатического потенциала крови и обосновывает возможность его коррекции путем комбинированного применения гемостатиков с разным механизмом действия в субэффективных концентрациях. Перенос этого подхода в клиническую практику может повысить эффективность гемостатической терапии при травматической коагулопатии без существенного увеличения риска тромботических осложнений. Установленные в работе принципы коррекции гемостатического потенциала крови, учитывающие тяжесть гемодилуции, наличие гиперфибринолиза и механизмы его индукции, содержание и функциональное состояние тромбоцитов, свидетельствуют о необходимости персонализированного применения фармакологических гемостатических средств в клинической практике. Полученные данные являются также экспериментальным обоснованием для проведения соответствующих клинических исследований.

Разработанный И. А. Будником новый подход к оценке адгезивной и агрегационной функции тромбоцитов и их участия в формировании кровяного сгустка, учитывающий содержание тромбоцитов в крови, может быть использован для выявления дисфункции тромбоцитов у пациентов с тромбоцитопенией различного генеза и более точной оценки гемостатического потенциала крови и определения степени геморрагического риска.

При исследовании возможности коррекции генерации тромбина при тромбастении Гланцмана с помощью концентрата рекомбинантного активированного фактора VII были выявлены различные паттерны ответа, что объясняет значительную вариабельность гемостатической эффективности этого препарата при указанной патологии. Данный подход может быть использован в клинической практике для предварительной оценки чувствительности пациента к рекомбинантному активированному фактору VII, персонализированного подбора дозы препарата и прогнозирования эффективности гемостатической тера-

пии. Установленная в работе возможность коррекции формирования кровяного сгустка в модели тромбастении Гланцмана путем стимуляции тромбоцитов через рецепторы, сопряженные с гетеротримерным G-белком, уточняет представления о роли этих рецепторов и интегринов $\alpha IIb\beta 3$ в регуляции прокоагулянтной функции тромбоцитов, а также открывает новое патогенетически обоснованное направление гемостатической терапии.

Результаты диссертационного исследования расширяют фундаментальные знания о закономерностях формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет» в динамике агрегации тромбоцитов и влиянии на этот процесс ингибиторов функций тромбоцитов. При этом установлено, что амплитуда агрегации тромбоцитов не всегда отражает степень угнетения функциональной активности тромбоцитов и что анализ формирования указанного комплекса может стать основой для разработки нового метода оценки остаточной реактивности тромбоцитов для персонализированного подбора дозы и вида анти-тромбоцитарных препаратов.

Использованные в работе экспериментальные модели состояний высокого геморрагического риска могут быть использованы и другими исследователями для изучения возможности коррекции гемостатического потенциала крови с помощью новых гемостатических средств.

Связь темы диссертации с планом научных исследований

Тема диссертации утверждена на заседании Межфакультетского ученого совета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 25.06.2019, протокол № 6.

Личное участие соискателя

в получении результатов, изложенных в диссертации

Автору принадлежит ведущая роль в выборе научного направления, постановке цели и задач, выборе методов исследования. Автор самостоятельно выполнил все описанные в диссертации эксперименты, статисти-

ческую обработку, анализ и обобщение полученных результатов, сформулировал выводы и практические рекомендации. Автор лично представлял результаты диссертационного исследования на различных научных мероприятиях, в том числе в виде устных выступлений, и внес определяющий вклад в оформление полученных результатов в виде статей, опубликованных в рецензируемых научных изданиях.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Высокая достоверность результатов, полученных И. А. Будником, обеспечена достаточным объемом экспериментального материала, применением современных методов исследования, адекватных поставленной цели и задачам исследования, использованием сертифицированного оборудования и реактивов, проведением статистического анализа результатов исследования с помощью методов, соответствующих дизайну конкретного эксперимента. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, аргументированы и обоснованы полученными результатами.

Первичная документация проверена и соответствует материалам диссертации.

Внедрение результатов диссертации в практику

Результаты диссертационного исследования 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 Минздрава России (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.

Научная специальность, которой соответствует диссертация

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.03.03 – Патологическая физиология (медицинские науки). Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований специальности, конкретно пунктам 1, 2, 9 и 10.

Полнота опубликования в печати

Результаты диссертационного исследования в полном объеме изложены в 16 статьях, из которых 4 опубликованы 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 (средневзвешенный импакт-фактор — 2,497) и считающихся входящими в указанный перечень (в соответствии с письмом Министерства образования и науки Российской Федерации № 13-6518 от 01.12.2015):

1. Будник, И. А. Современные представления о сдвиговой регуляции функции тромбоцитов / И. А. Будник, Г. Е. Бриль // Успехи современной биологии. — 2009. — Т. 129, № 2. — С. 198–211.
2. Differential roles of fibrinogen and von Willebrand factor on clot formation and platelet adhesion in reconstituted and immune thrombocytopenia / M. Misgav, B. Shenkman, I. Budnik, Y. Einav, U. Martinowitz // Anesthesia and Analgesia. — 2011. — Vol. 112, № 5. — P. 1034–1040. — DOI: 10.1213/ANE.0b013e318212fffc.
3. The *in-vitro* effect of fibrinogen, factor XIII and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor on clot formation and susceptibility to tissue plasminogen activator-induced fibrinolysis in hemodilution model / B. Shenkman, T. Livnat, A. Lubetsky, I. Tamarin, I. Budnik, Y. Einav, U. Martinowitz // Blood Coagulation and Fibrinolysis. — 2012. — Vol. 23, № 5. — P. 370–378. — DOI: 10.1097/MBC.0b013e328352cb3f.

4. Plasma tissue-type plasminogen activator increases fibrinolytic activity of exogenous urokinase-type plasminogen activator / B. Shenkman, T. Livnat, I. Budnik, I. Tamarin, Y. Einav, U. Martinowitz // *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. — 2012. — Vol. 23, № 8. — P. 729–733. — DOI: 10.1097/MBC.0b013e32835897d5.
5. The *in vivo* effect of fibrinogen and factor XIII on clot formation and fibrinolysis in Glanzmann's thrombasthenia / B. Shenkman, T. Livnat, M. Misgav, I. Budnik, Y. Einav, U. Martinowitz // *Platelets*. — 2012. — Vol. 23, № 8. — P. 604–610. — DOI: 10.3109/09537104.2011.642031.
6. *In vitro* evaluation of clot quality and stability in a model of severe thrombocytopenia: effect of fibrinogen, factor XIII and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor / B. Shenkman, Y. Einav, T. Livnat, I. Budnik, U. Martinowitz // *Blood Transfusion*. — 2014. — Vol. 12, № 1. — P. 78–84. — DOI: 10.2450/2013.0068-13.
7. Rotation thromboelastometry analysis of clot formation and fibrinolysis in severe thrombocytopenia: effect of fibrinogen, activated prothrombin complex concentrate, and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor / B. Shenkman, Y. Einav, T. Livnat, I. Budnik, U. Martinowitz // *International Journal of Laboratory Hematology*. — 2015. — Vol. 37, № 4. — P. 521–529. — DOI: 10.1111/ijlh.12331.
8. Budnik, I. Synergistic effect of signaling from receptors of soluble platelet agonists and outside-in signaling in formation of a stable fibrinogen–integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –actin cytoskeleton complex / I. Budnik, B. Shenkman, N. Savion // *Thrombosis Research*. — 2015. — Vol. 135, № 1. — P. 114–120. — DOI: 10.1016/j.thromres.2014.10.005.
9. Budnik, I. Role of G protein signaling in formation of the fibrin(ogen)–integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –actin cytoskeleton complex in platelets / I. Budnik, B. Shenkman, N. Savion // *Platelets*. — 2016. — Vol. 27, № 6. — P. 563–575. — DOI: 10.3109/09537104.2016.1147544.
10. Model of trauma-induced coagulopathy including hemodilution, fibrinolysis, acidosis and hypothermia: Impact on blood coagulation and platelet function / B. Shenkman, I. Budnik, Y. Einav, H. Hauschner, M. Andrejchin, U. Martinowitz

- // Journal of Trauma and Acute Care Surgery. — 2017. — Vol. 82, № 2. — P. 287–292. — DOI: 10.1097/TA.0000000000001282.
11. Влияние концентратов фибриногена, фактора XIII и активируемого тромбином ингибитора фибринолиза на плотность и фибринолитическую устойчивость кровяного сгустка в модели гиперфибринолиза / И. А. Будник, О. Л. Морозова, А. А. Цымбал, Б. Шенкман, Ю. Эйнав // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2017. — Т. 61, № 4. — С. 44–50. — DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8522.
 12. Correction of coagulopathy in thrombocytopenia and Glanzmann thrombasthenia models by fibrinogen and factor XIII as assessed by thromboelastometry / I. Budnik, B. Shenkman, O. Morozova, J. Andreichyn, Y. Einav // Pathophysiology. — 2018. — Vol. 25, № 4. — P. 347–351. — DOI: 10.1016/j.pathophys.2018.05.005.
 13. Role of heterotrimeric G proteins in platelet activation and clot formation in platelets treated with integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ inhibitor / I. Budnik, B. Shenkman, H. Hauschner, U. Martinowitz, N. Savion // Platelets. — 2018. — Vol. 29, № 3. — P. 265–269. — DOI: 10.1080/09537104.2017.1295136.
 14. Анализ влияния транексамовой кислоты, фактора XIII и концентрата фибриногена на формирование и лизис кровяного сгустка при избыточном фибринолизе, индуцированном тканевым и урокиназным активатором плазминогена / И. А. Будник, О. Л. Морозова, А. А. Цымбал, Б. Шенкман, Ю. Эйнав // Гематология и трансфузиология. — 2018. — Т. 63, № 1. — С. 55–64. — DOI: 10.25837/HAT.2018.86..1..005.
 15. Коррекция формирования кровяного сгустка с помощью концентрата фибриногена и активированного концентрата протромбинового комплекса в модели тяжелой тромбоцитопении / И. А. Будник, О. Л. Морозова, А. А. Цымбал, Б. Шенкман, Ю. Эйнав // Патогенез. — 2018. — Т. 16, № 2. — С. 23–29. — DOI: 10.25557/2310-0435.2018.02.23-29.
 16. Low concentrations of recombinant factor VIIa may improve the impaired thrombin generation of Glanzmann thrombasthenia patients / S. Levy-Mendelovich, T. Levy, I. Budnik, A. Arie Barg, N. Rosenberg, U. Seligsohn,

G. Kenet, T. Livnat // *Thrombosis and Haemostasis*. — 2019. — Vol. 119, № 1. — P. 117–127. — DOI: 10.1055/s-0038-1676348.

Представление результатов диссертации на научных мероприятиях

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на следующих научных мероприятиях: XXII Congress of the ISTH (США, 2009); the 6th International Platelet Symposium (Израиль, 2010); the 6th Congress of the Federation of all the Israel Societies for Experimental Biology (Израиль, 2011); XXIII Congress of the ISTH (Япония, 2011); the 21st International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis (Великобритания, 2012); XXIV Congress of the ISTH (Нидерланды, 2013); the 8th International Platelet Symposium (Израиль, 2014); XXV Congress of the ISTH (Канада, 2015); VI Международная конференция «Проблема безопасности в анестезиологии» (Москва, 2015); XVII Всероссийская конференция с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» (Москва, 2015); VI Международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения — 2015» (Санкт-Петербург, 2015); the 60th Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research (Германия, 2016); the 36th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine (Бельгия, 2016); X юбилейная Международная научно-практическая конференция молодых ученых-медиков (Курск, 2016); XXII Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии — 2016» (Санкт-Петербург, 2016); III Конгресс гематологов России (Москва, 2016); 70-я юбилейная Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки» (Ярославль, 2016); XIX Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2016); the 21st Congress of

the European Hematology Association (Дания, 2016); 15-й Съезд общероссийской общественной организации «Федерация анестезиологов и реаниматологов» (Москва, 2016); 8-я Всероссийская конференция по клинической гемостазиологии и гемореологии (Москва, 2016); Международная конференция травматологов-ортопедов «Применение современных технологий лечения в российской травматологии и ортопедии» (Москва, 2016); XXIII Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии — 2017» (Санкт-Петербург, 2017); XXVI Congress of the ISTH (Германия, 2017); XXXIII International Congress of the World Federation of Hemophilia (Великобритания, 2018); XXIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Лабораторная служба в современных реалиях» (Москва, 2019).

Заключение

Диссертационная работа Будника Ивана Александровича на тему «Механизмы нарушений гемостатического потенциала крови и пути его коррекции при геморрагических состояниях» по специальности 14.03.03 – Патологическая физиология является законченной научно-квалификационной работой и полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям.

Диссертация соответствует требованиям пункта 14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., и не содержит заимствованного материала без ссылки на автора.

Диссертация Будника Ивана Александровича на тему «Механизмы нарушений гемостатического потенциала крови и пути его коррекции при геморрагических состояниях» рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.03 – Патологическая физиология.

Заключение принято на заседании кафедры патофизиологии Института клинической медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Присутствовало на заседании 14 человек (в т. ч. 8 докторов медицинских наук, из них 6 — по специальности рассматриваемой диссертации).

Результаты голосования: «за» — 14 человек, «против» — 0 человек, «воздержалось» — 0 человек, протокол № 5 от 01.11.2019.

Председатель
д. м. н., профессор, чл.-корр. РАН,
заведующий кафедрой патофизиологии
Института клинической медицины
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет)

П. Ф. Литвицкий

Согласовано:

Директор Центра аттестации
научно-педагогических работников

Н. И. Аристер