

ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертационную работу Подоплеловой Надежды Александровны
«Взаимодействие факторов свертывания крови с субпопуляциями
активированных тромбоцитов», представленную на соискание ученой
степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.02 – биофизика

В настоящее время одной из важнейших фундаментальных задач медицины, биофизики и биохимии является исследование закономерностей функционирования системы свертывания крови человека и, как следствие возможное предотвращение таких паталогических состояний, как инсульт, инфаркт, спонтанный тромбоз и т.д. Диагностика и коррекция нарушений в системе свертывания крови затруднены сложностью этого процесса, в котором задействованы десятки белков, взаимодействующих в сотнях реакций друг с другом, клетками крови и сосудистой стенкой. При этом отдельно стоит отметить, что все основные реакции свертывания крови протекают на отрицательно заряженных фосфолипидных мембранах, в отсутствие которых большинство ферментов проявляют незначительную активность по отношению к своим субстратам. В организме человека такие поверхности предоставляют активированные тромбоциты и их микровезикулы. При сильной активации физиологическими агонистами тромбоциты разделяются на две субпопуляции драматически отличающиеся по своей способности связывать факторы свертывания и поддерживать реакции свертывания. Однако, несмотря на это для большинства факторов при изучении их взаимодействия с тромбоцитами, гетерогенность тромбоцитов не учитывается.

В сложившейся ситуации представляется чрезвычайно важным разобраться в механизмах взаимодействия факторов свертывания с активированными тромбоцитами с учетом их деления на субпопуляции. Именно этому посвящена диссертационная работа Подоплеловой Надежды Александровны.

Диссертационная работа объемом 102 страницы состоит из введения, трех содержательных глав, заключения, отдельно сформулированных выводов, списка

цитированной литературы из 128 источников, а также списка сокращений и обозначений.

Во введении убедительно обоснована актуальность изучения механизмов мембранно-зависимых реакций свертывания крови. Здесь же охарактеризована научная новизна, практическая и теоретическая значимость полученных результатов, личный вклад автора, информация об апробации диссертации, ее структуре и объеме.

В обзоре литературы подробно изложены современные представления о механизмах работы ключевых мембранно-зависимых реакций свертывания крови, о структуре и функциях факторов, входящих в их состав. Кроме того проанализирована имеющаяся информация по взаимодействию факторов свертывания, как с тромбоцитами, так с искусственными фосфолипидными мембранами.

На основании проведенного анализа литературы была поставлена цель работы: исследовать взаимодействие факторов свертывания крови с мембранами активированных тромбоцитов с учетом их деления на субпопуляции.

Для достижения указанной цели поставлены следующие задачи: 1) исследовать зависимость равновесного связывания факторов свертывания X и Xa с активированными тромбоцитами от их концентрации; 2) исследовать кинетические характеристики связывания факторов X и Xa с активированными тромбоцитами; 3) сравнить распределение факторов свертывания на мембранах активированных тромбоцитов с учетом их деления на субпопуляции; 4) Изучить распределение факторов свертывания на поверхности тромбоцитов при формировании тромбоцитарного тромба в проточной камере.

В главе 2, посвященной материалам и методам, подробно описаны объекты исследования, приведены методы выделения тромбоцитов из цельной крови, их активации различными агонистами, методы получения искусственных фосфолипидных везикул. Также изложены методики оценки связывания факторов свертывания с активированными тромбоцитами с использованием проточного цитометра, конфокального микроскопа и методом поверхностного плазмонного резонанса.

В главе 3 описаны основные результаты, полученные автором. Одним из важных результатов данной работы является то, что связывание факторов с фосфолипидными мембранами представляет собой многостадийный процесс, в ходе которого могут образовываться мультимеры факторов X/Ха. Такие мультимеры оказываются более прочно связаны с мембраной из-за чего диссоциируют хуже, чем мономеры. Данный феномен сохраняется при различных типах активации тромбоцитов, а так же на искусственных фосфолипидных везикулах различного состава. Кроме того факторы свертывания, связываясь преимущественно с фосфатидилсерин-положительными тромбоцитами, концентрируются в небольшой области мембраны, где их средняя концентрация оказывается выше в несколько раз. Такое распределение может иметь две функции: резкое увеличение скорости мембранных реакций за счет повышения локальной концентрации факторов и предотвращение вымывания факторов из тромба в условиях потока. Кроме того в диссертации была проведена большая работа по характеристике ультраструктуры активированных тромбоцитов методами электронной микроскопии. В том числе была сделана детальная 3D-реконструкция всего тромбоцита.

Таким образом, надежность, достоверность и ценность полученных экспериментальных результатов не вызывает сомнений, а объем выполненных исследований может быть охарактеризован как очень значительный.

При прочтении диссертации возникает ряд замечаний и вопросов. В материалах и методах только упомянуто, что активность факторов после конъюгирования с флуоресцентной меткой была не менее 80% от исходной, однако отсутствует подробное описание того, каким образом данная активность оценивалась. Кроме того отсутствуют данные о том, оценивали ли наличие свободных молекул краски в препарате белка. Эти данные могут быть важны при пересчете флуоресценции в количество связавшихся молекул фактора. Автор использует для активации тромбоцитов различные агонисты: тромбин, CRP, либо их смесь. Однако, нигде не объясняет с чем вызван такой выбор и почему не были использованы другие агонисты, например, АДФ.

Тем не менее, указанные замечания не имеют принципиальный характер и не уменьшают значимость работы.

По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе в виде статей в отечественных и международных журналах, рекомендованных ВАК РФ и включенных в базу цитирования Web of Science и тезисов докладов на конференциях различного уровня.


В заключение можно отметить, что в диссертационной работе Подоплеловой Н.А. проведено комплексное систематическое исследование с применением широкого набора современных биофизических методов. Автореферат полностью раскрывает основные положения диссертации. Научная и практическая значимость работы несомненна. Данная диссертационная работа отвечает требованиям установленным пунктами 9 – 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года, с изменениями Постановления Правительства РФ № 335 от 21 апреля 2016 года, в редакции Постановления Правительства РФ № 748 от 02 августа 2016 года, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сам диссертант, Подоплелова Н.А., несомненно заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Официальный оппонент,
Ведущий научный сотрудник лаборатории тканевой инженерии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт Теоретической и Экспериментальной
Биофизики Российской Академии Наук




Д. б. н.

Холмухамедов, Эхсон Лукманович

Подпись: 
УДОСТОВЕРЯЮ – ЗАВ. КАБ. Е. В. ГРУЗДЕВА

142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 3

Тел. +7 (495) 632-78-69

E-mail: ekhson@gmail.com

Подпись профессора, д.б.н., Э. Л. Холмухамедова заверяю.

31 марта 2017г