

Отзыв

официального оппонента

о диссертационной работе 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

Работа Подоплеловой Надежды Александровны посвящена исследованию механизмов взаимодействия факторов свертывания с отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами.

Свертывание крови представляет собой сложный каскад биохимических реакций, задачей которого является формирование фибринового сгустка для остановки кровотоков. Это жизненно важная защита организма, неправильное функционирование которой угрожает тромбозами и является ведущей причиной смертности и инвалидности в современном мире. При этом большинство основных реакций свертывания крови протекают не в объеме, а на отрицательно заряженных фосфолипидных мембранах. Физиологическим источником таких фосфолипидных мембран являются активированные тромбоциты и клеточные микровезикулы. Таким образом, важным шагом к пониманию механизмов мембранно-зависимых реакций свертывания крови является изучение взаимодействия факторов свертывания с мембранами активированных тромбоцитов.

Из результатов диссертационной работы Подоплеловой Н. А. следует, что при связывании с отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами факторы X и Xa претерпевают изменения, которые затрудняют их диссоциацию с мембраны. В экспериментах с тромбоцитарными тромбами, полученными в проточных камерах, продемонстрировано, что фиксация фактора Xa на клетках может препятствовать его вымыванию из тромба в условиях потока.

Другим важным результатом является то, что факторы свертывания преимущественно сконцентрированы в небольшой области мембраны фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов. Такое распределение может приводить к ускорению до 50 раз реакции активации фактора X комплексом внутренней теназы и как следствие способствовать быстрому росту тромба в условиях потока.

Таким образом, в данной работе получены уникальные данные по механизмам взаимодействия факторов свертывания с фосфолипидными мембранами, которые могут применяться для разработки новых подходов к диагностике и лечению сердечно-сосудистых заболеваний.

Диссертационная работа Подоплеловой Н.А. построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов (глава 2), изложения собственных исследований автора (глава 3), заключения, выводов, списка сокращений и обозначений и списка цитированной

литературы. Работа изложена на 102 страницах машинописного текста, содержит 40 рисунков и 1 таблицу. Библиография включает 128 источников.

Во введении обоснована актуальность темы, четко сформулированы цель и задачи исследования, охарактеризована научная новизна и практическая значимость полученных результатов. Автор формирует в качестве цели диссертационной работы исследование взаимодействия 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.

Все поставленные цели и задачи успешно выполнены и сформулированы в виде положений, выносимых на защиту.

Литературный обзор (глава 1) содержит современные данные о механизмах взаимодействия факторов свертывания, как с тромбоцитами, так и с искусственными фосфолипидными везикулами. В целом обзор литературы написан хорошим научным языком, приведенные автором материалы дают достаточно полное представление относительно проблематики исследования в области свертывания крови.

В следующей главе 2 представлены материалы и методы, применяемые автором данной работы. Из данного раздела диссертации следует, что работа выполнена на современном методическом уровне и на надежном аналитическом оборудовании. Комплексное использование нескольких методов таких как проточная цитометрия, конфокальная микроскопия и поверхностный плазмонный резонанс обеспечивают надежность и достоверность полученных данных.

Глава 3 содержит собственные результаты автора.

Текст диссертации и автореферата изложен хорошим литературным языком, представленный иллюстративный материал нагляден и удобен для восприятия. Все полученные в работе результаты являются новыми, а их достоверность обусловлена применением современного оборудования, надежных и адекватных методов исследования.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации, в нем отражены главные идеи исследования и представлены научные выводы.

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.

Замечания и вопросы для обсуждения.

1. Положение 3, выносимое на защиту, сформулировано в предположительной форме. Если мультимеризация фактора Ха не доказана, то обсуждение ее возможных последствий вряд ли целесообразно.

2. Литературный обзор, при всей его обстоятельности, содержит лишь единичные работы 2015 и 2016 годов. Современные представления о сборке факторов свертывания на мембране даются на основе обзорной статьи Zwaal 1998, работ Krishnaswami 1998, Neshaim 1981 и других статей 20-летней и более давности.

3. В разделе «Материалы» не указан источник приобретения как минимум 4-х реагентов.

4. Раздел «Статистическая обработка» не содержит описания методов анализа. Ссылка на платформу Origin таким описанием не является.

5. Обычно тромбоциты выделяются либо центрифугированием, либо гель-фильтрацией. Автор использовал комбинированную двухступенчатую процедуру: сначала центрифугирование, потом гель-фильтрация. В чем преимущества такого подхода?

6. В разделе «Методы» не указан «сканирующий электронный микроскоп с фокусированным ионным лучем». Поскольку это 2 разных физических принципа, следует указать, каким образом они совмещены и в чем состоит преимущество этого прибора для биологических исследований. Скорее всего, речь идет о микроскопе Zeiss FIB-SEM, но это догадка.

7. Микроскоп Axio Observer Z1 назван конфокальным микроскопом, тогда как это обычный инвертированный микроскоп. Очевидно, имеется в виду система Zeiss LSM 780 AxioObserver.Z1 на основе этого микроскопа.

8. После покрытия стекол фибриногеном они высушивались для последующего использования в адгезии тромбоцитов. Почему автор думает, что после высушивания фибриноген сохранял структуру и свойства, необходимые для специфического связывания с тромбоцитарным интегрином?

Высказанные замечания не влияют на общее положительное впечатление от диссертационной работы и не ставят под сомнение обоснованность ее основных положений и выводов.

Считаю, что диссертационная работа Подоплеловой Надежды Александровны «Взаимодействие факторов свертывания крови с субпопуляциями активированных тромбоцитов» является законченным научно-квалификационным исследованием. 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,
Профессор кафедры биохимии и биотехнологии
Института фундаментальной медицины и биологии
Казанского федерального университета
Доктор медицинских наук

Рустем Игоревич Литвинов



Адрес: РФ, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18,
Учебное здание №01 (Главный корпус университета)
Тел. +7 (843) 233-71-09
E-mail: litvinov@mail.med.upenn.edu

Подпись профессора, д.м.н., Р.И. Литвинова заверяю.

28.03.17г.

