

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Маевского Евгения Ильича о диссертационной работе Колядко Владимира Николаевича на тему «Механизмы избирательного ингибирования контактного пути свертывания крови каноническими ингибиторами», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности биофизика – 03.01.02

Актуальность темы. Диссертационная работа Колядко В.Н. посвящена изучению ингибиторов контактного пути свертывания крови. Свертывание крови и образование в ней сгустка являются результатом взаимодействия между двумя звеньями гемостаза: тромбоцитами и группой плазменных белков, так называемых факторов свертывания, которые активируются последовательно в ходе ферментативного каскада реакций свертывания. Образование сгустка может происходить при контакте крови с чужеродной поверхностью различных материалов. При этом происходят активация реакций свертывания по контактному пути и адгезия тромбоцитов на чужеродной поверхности. Факторы свертывания сорбируются на поверхность и активируются на ней. После адгезии тромбоциты активируются и предоставляют свою поверхность для ускорения реакций свертывания. Продукт этих реакций – тромбин, в свою очередь индуцирует активацию тромбоцитов и их агрегацию. Контактная активация свертывания является одной из причин таких нежелательных осложнений, как катетер-ассоциированный тромбоз, реактогенность и анафилактогенность кровезаменителей, тромбогенность имплантируемых материалов. Достаточно вспомнить о том, что именно реактогенность и непредсказуемое развитие анафилактоидных реакций явились основной причиной неудач большинства программ создания ряда эмульсионных препаратов на основе дисперсий перфторуглеродов бромперфторуглеродов и многих видов жировых эмульсий на заключительных стадиях клинических исследований в последние полвека. Таким образом,

ингибирование контактной активации является важной проблемой, определяющей высокую актуальность рецензируемой работы.

Диссертация Колядко В.Н. состоит из введения, обзора литературы, постановки цели и задач исследования, материалов и методов, изложения собственных результатов, обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, а также списка цитируемой литературы (186 источников). Работа представлена на 135 страницах и содержит 44 рисунка, 12 таблиц.

Во **введении** квалифицировано обоснована актуальность проблемы повышения избирательности ингибирования контактного пути свертывания. Охарактеризованы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология исследования, личный вклад автора и представлена информация об апробации диссертация.

В **обзоре литературы** подробно изложены современные представления о механизме контактной активации свертывания, известных ингибиторах этого пути, механизме действия канонических ингибиторов протеаз. На основании анализа литературных данных сделаны выводы о том, что канонические ингибиторы фактора XIIa могут эффективно предотвращать контактную активацию в условиях *in vitro* и *in vivo*. Однако их применению крайне ограничено вследствие очень низкой селективности, механизм которой практически не известны. Результаты анализа позволили автору четко сформулировать цель и задачи диссертационного исследования:

**Цель** рецензируемой диссертационной работы заключалась в изучении механизмов избирательного ингибирования контактного пути свертывания крови каноническими ингибиторами.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

- Определить селективность ингибирования факторов XIIa, XIa и калликрейна прямыми каноническими ингибиторами (инфестином-4, ингибиторами трипсина из кукурузы, огурца и тыквы);

- Внести мутации в участок протеаза-связывающей петли инфестина-4 для изучения ее роли в селективном ингибировании фактора XIIa;
- Исследовать специфичность действия мутантов инфестина-4 на контактный путь свертывания, который активируется в плазме без участия тромбоцитов;
- Определить взаимодействия мутантов инфестина-4 с протеазами свертывания (факторами XIIa и XIa).

В описании **материалов и методов** исследования подробно изложены процедуры получения и очистки рекомбинантных ингибиторов, методики измерений констант ингибирования и эффективных концентраций ингибиторов в плазме, методы исследования динамики свертывания и активации тромбоцитов, процедура молекулярно-динамического моделирования, указаны наименования используемого оборудования и условия проведения экспериментов.

**Результаты** собственных исследований представлены в пяти логически связанных между собой разделах главы 3: в первом разделе - получение канонических ингибиторов и исследование их селективности; во втором - выбор инфестина-4 для внесения мутаций и выявление изменений в его структуре и селективности, вызванных мутациями; в третьем - изучение механизма действия ингибитора и определение возможных межмолекулярных взаимодействий, которые могут объяснить повышение селективности; в четвертом - изучение специфичности мутантного ингибитора к контактному пути свертывания в плазме и определение возможностей практического применения такого ингибитора; и, наконец, в пятом - изучение механизма регуляции функции тромбоцитов, активирующих контактный путь в крови.

В разделе 3.1. показано, что для получения рекомбинантных ингибиторов инфестина-4 и тыквенного ингибитора трипсина СМТИ-III в активной конформации и с высоким выходом созданы системы бактериальной экспрессии и оптимизированы условия выделения. Определена ингибирующая

активность относительно факторов свертывания для инфестина-4 и СМТИ-III, а также для кукурузного и огуречного ингибиторов трипсина – КТИ и LCTI-III, соответственно. Показано, что инфестин-4 является наиболее активным ингибитором фактора XIIa, а измеренные константы ингибирования соответствуют ранее опубликованным значениям. Для СМТИ-III и LCTI-III впервые выявлено неспецифическое, фактор XII-независимое влияние на динамику роста фибринового сгустка.

Раздел 3.2. посвящен изучению вклада мутаций в инфестине-4 в формирование его структуры и ингибирующую активность. В протеазасвязывающую петлю ингибитора внесены аминокислотные замены, которые, как впервые было показано моделированием молекулярной динамики, могут стабилизировать каноническую конформацию петли. У мутантов экспериментально обнаружено повышение селективности к фактору XIIa относительно других протеаз на 2 порядка величины по сравнению с диким типом инфестина-4.

В разделе 3.3. доказано, что **мутант В** инфестина-4, обладающий наибольшей селективностью, ингибирует фактор XIIa по конкурентному механизму. Предложено объяснение понижения неспецифической активности этого мутанта относительно фактора XIa за счет взаимодействия с каталитическими остатками, нарушающего стандартный механизм ингибирования. Проанализирован вклад в селективность ингибитора, который может вносить автолитическая петля фактора XIIa.

В разделе 3.4. убедительно доказано, что ингибиторы, имеющие достаточно высокую селективность к фактору XIIa (мутант В инфестина-4 и кукурузный ингибитор), специфически ингибируют свертывание, активированное только по контактному пути, но не по пути тканевого фактора. Этот важный вывод сделан на основании результатов, полученных несколькими методами исследования: времени свертывания, генерации тромбина, тромбоэластографии и тромбодинамики. Продемонстрированы

возможности применения таких ингибиторов для предотвращения артефактов контактной активации в ходе забора крови у донора и проведения диагностического теста гемостаза, что говорит о высокой практической ценности ингибиторов.

В заключительном разделе 3.5. описан механизм регуляции доли тромбоцитов с экспонированным на поверхности фосфатидилсеринем. Такие тромбоциты вызывают активацию контактного пути. Показано, что механизм заключается в ингибировании трансглутаминазной активности, и предположено, что он может стать основой для альтернативного способа предотвращения контактной активации без использования прямых ингибиторов фактора XIIa.

**Обсуждение** полученных результатов строится путем их критического сопоставления с результатами, представленными в литературе другими исследователями. При этом приведены преимущества и ограничения проведенного исследования. Качественное и количественное совпадение результатов соискателя с ранее опубликованными данными свидетельствует о высокой степени достоверности результатов и выводов диссертационной работы. В **заключении** соискатель описывает кратко перспективы научного и практического применения результатов диссертационной работы.

В целом, диссертационная работа Колядко В.Н. выполнена на современном методическом уровне с использованием адекватных поставленным задачам экспериментальных подходов, которые широко используются при изучении свойств белковых ингибиторов системы свертывания. Положения, выносимые на защиту, отражают главные результаты работы.

Диссертационная работа обладает безусловной научной новизной; основные результаты по влиянию аминокислотного состава петли инфестина-4 на его селективность и по действию нового ингибитора на динамику

свертывания получены впервые. Практическая значимость результатов работы несомненна.

Диссертация написана хорошим научным языком. Автореферат полностью раскрывает содержание диссертации. Основные результаты диссертации опубликованы в 11 научных работах, включая 5 статей в рецензируемых научных изданиях, 2 патента и тезисы 4 докладов на российских и международных конференциях.

Считаю необходимым сделать замечания и указать на некоторые недостатки диссертационной работы. Так, во введении на стр. 7 диссертации (стр. 5 автореферата) в разделе научная новизна, на мой взгляд, автор выразился излишне витиевато «... показано, что формирование тромбоцитов, которые при стимуляции экспонируют фосфатилсерин и могут активировать контактный путь ...». Гораздо яснее было бы написать о формировании прокоагулянтной поверхности тромбоцитов.

Кстати, вполне справедливо, указывая на важный полученный результат об альтернативном блокировании контактного пути тромбогенеза путем ингибирования трансглутаминазной активности, соискатель не посчитал нужным упомянуть это исследование при формулировании задач и не стал включить важный результат в завершающие работу выводы.

В главе «Обзор литературы» автору работы следовало подробнее рассмотреть проблему снижения тромбогенности различных и в больших масштабах имплантируемых материалов. В свете острой актуальности проблемы тромбогенности и реактогенности следовало бы привести сравнительные характеристики для различных материалов относительно частоты и вероятности развития этих осложнений при использовании имплантов, контактирующих с кровью.

При описании результатов исследования непонятно, почему соискатель не показал уровень селективности ингибирования протеазной активности на примере плазмينا в зависимости от концентрации КТИ (на рис. 25, стр. 83,

подраздел 3.1.3.), тогда как именно в отношении плазмина наиболее выражен провал в селективности ингибирования инфестином-4.

В главе «Обсуждение» стоило бы обсудить не только получение канонических ингибиторов в виде рекомбинантных белков, но и их получение с помощью органического синтеза.

Соискателем показано в диссертационной работе применение мутанта В инфестина-4 для подавления артефактов контактной активации в плазме, в которой состояние гипокоагуляции и гиперкоагуляции было смоделировано путем добавления нефракционированного гепарина и фактора XIa, соответственно. В качестве пожелания для будущих исследований автора, но не в качестве замечания, хотелось бы порекомендовать исследовать влияние мутантов инфестина-4 на свертывание в образцах плазмы, полученных от пациентов, находящихся на антикоагулянтной терапии.

Считаю необходимым отметить, что указанные замечания не могут сколько-нибудь принципиально повлиять на высокую позитивную оценку работы. Они ни в коем случае не ставят под сомнение обоснованность основных положений, результатов и выводов и не уменьшают значимость диссертационной работы.

Заключение. Диссертационная работа Колядко В.Н. «Механизмы избирательного ингибирования контактного пути свертывания крови каноническими ингибиторами» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой на высоком профессиональном уровне решены поставленные задачи. По сути результаты работы открывают новые перспективы для решения ряда актуальных проблем биофизики свертывания крови, играющих ключевую роль в формировании практических подходов к повышению биосовместимости новых имплантационных и трансплантационных материалов. Рецензируемая диссертация отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями

Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02 августа 2016 г. № 748), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Колядко В.Н. заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Заместитель директора по науке,  
зав. лабораторией энергетики  
биологических систем  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института теоретической и  
экспериментальной биофизики  
Российской академии наук,  
доктор медицинских наук, профессор

Маевский Евгений Ильич



Адрес: 42290, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3  
Телефон: +7 (4967) 73-26-48  
E-mail: maevsky.eugene@gmail.com

31.03.2017