

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Рошупкина Дмитрия Ивановича 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.

Свертывание крови – это сложное двуликое явление. Как известно, при повреждении сосудистого русла свертывание крови представляет собой физиологический процесс, предотвращающий значительную потерю крови. При патологических состояниях может протекать внутрисосудистое свертывание крови (тромбоз). В артериальной части системы кровообращения тромбоз инициируется рецепторной активацией тромбоцитов в месте повреждения сосудов, а в венозной части он происходит без участия тромбоцитов. В артериях в результате активации и агрегации тромбоцитов включается плазменное звено коагуляции крови. В клинической практике широко и с большим терапевтическим успехом используются антиагреганты (ингибиторы функций тромбоцитов) и антикоагулянты. Однако до сих пор остается много серьезных проблем, касающихся регуляции свертывания крови. Одна из этих проблем – предотвращение свертывания крови при контакте с чужеродными поверхностями. Такая ситуация возникает при заборе крови для ее лабораторного анализа, при использовании катетеров и определенных протезов. Процесс контактной коагуляции крови начинается с активации сериновой протеазы, именуемой фактором XII (фактор Хагемана). Рецензируемая диссертация, посвященная изучению механизма ингибирующего действия на эту протеазу группы известных белковых ингибиторов и созданию новых избирательных ингибиторов, вне всякого сомнения, является актуальным исследованием.

Научная новизна диссертации.

Описанная в диссертации и в автореферате сущность новизны исследований в целом соответствует полученным данным и имеющимся сведениям в литературе. Прежде всего, необходимо отметить, что установлено наличие у некоторых ранее известных ингибиторов фактора XIIa значительной ингибирующей активности против других плазменных компонентов свертывания крови. Обсуждаемое диссертационное исследование ярко выделяется тем, что на основе известного белка инфестина-4 сконструированы и синтезированы новые белковые ингибиторы фактора XII, отличающиеся во много раз более высокой селективностью действия.

Научно-практическая значимость диссертации.

К значительным научным достижениям работы относится выяснение связи между структурой петли изоформ инфестина-4, участвующей в образовании комплекса с протеазой-мишенью, и их ингибирующей активностью. Это важно для понимания механизмов избирательного ингибирования исследуемой протеазы и для создания новых антикоагулянтов.

Общая характеристика и содержание диссертационной работы.

Диссертационная работа В.Н. Колядко построена по общепринятой схеме, состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов (глава 2), изложения собственных результатов автора (глава 3) и их обсуждения (глава 4), заключения, выводов, благодарностей и списка цитируемой литературы. Он включает 186 источников, из них 174 англоязычных. Работа изложена на 135 страницах печатного текста, содержит 44 рисунка и 12 таблиц.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи работы, описаны научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

В обзоре литературы в полной мере отражены научные данные, имеющиеся в литературе. Он составляет значительную часть диссертации, занимает примерно столько же страниц, что и результаты исследования в сумме с обсуждением.

В следующей главе представлены основные материалы и методы исследования, применяемые автором диссертации. В этой части описаны использованное научное оборудование, объекты и методы исследований. Работа выполнена на современном методическом уровне. Экспериментальные подходы можно охарактеризовать как адекватные поставленным задачам исследования. Используемые методы и технологии чрезвычайно разнообразны, требующие навыков работы не только области биофизики, включая моделирование молекулярных взаимодействий, но и в молекулярной биологии, биоинженерии, физиологии.

Основные собственные результаты исследования В.Н. Колядко, по нашему мнению, сводятся к следующему.

1. С использованием методов генной инженерии создан новый белковый антикоагулянт на основе инфестина-4, в последовательность которого внесены замены Phe9Thr, Tyr12Phe и Pro14Ala. Получены данные о том, что механизмом действия антикоагулянта сводится к конкурентному ингибированию активного фактора Хагемана (фактора свертывания XIIa).

2. Важно, что мутант инфестина-4 с заменами Phe9Thr, Tyr12Phe, Pro14Ala оказывает избирательное действие на активный фактор Хагемана. Эта избирательность обусловлена, с одной стороны, высокой константой связывания с активным фактором Хагемана (более 10^9 M^{-1}) и, с другой стороны, достаточно слабым взаимодействием с другими плазменными компонентами системы свертывания крови. Сниженное ингибирование

фактора Стюарта (фактора свертывания Ха) созданным мутантом инфестина-4, вероятно, непосредственно обусловлено тем, что в комплексе не происходит гидролиз петли ингибитора.

3. Изучен механизм действия мутантов инфестина-4 на систему свертывания крови. Как следствие высокой избирательности к активному фактору Хагемана, мутант Phe9Thr, Tyr12Phe, Pro14Ala специфически ингибирует генерацию тромбина и образование сгустка фибрина при активации свертывания по контактному пути, но не по пути тканевого фактора. Экспериментально установлено, что созданный антикоагулянт задерживает спонтанное появление сгустков в цельной крови и плазме. Все это говорит о том, что новый мутант инфестина-4 может найти практическое применение в качестве антикоагулянта при заборе крови, обеспечивающего увеличение времени манипуляций с жидкой кровью.

В целом, представленный в работе обширный экспериментальный материал не вызывает сомнений в достоверности. Основные научные положения и выводы, сформулированные на основе экспериментальных данных и с использованием анализа данных литературы, вполне обоснованы.

Автореферат диссертации адекватно отражает суть и основное содержание работы. Все основные результаты диссертации опубликованы в отечественных и зарубежных научных изданиях. По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, из них 5 – в рецензируемых научных журналах.

Замечания по диссертации.

(1) Прежде всего, следует отметить, что сущность анализа данных литературы, замыслы собственных экспериментов, их результаты интересны, понятны читателю диссертации. Однако не редкость того, что форма изложения материала не вполне соответствует его содержанию. Например, на стр. 37 почему-то прямо сравниваются величины константы ингибирования фактора XIIIa и эффективные концентрации ингибиторов. Ведь константа

ингибирования по определению не зависит от концентраций ингибитора и мишени. Недосказанность по смыслу обнаруживается в положениях, подлежащих защите (стр. 7-8). На стр. 112 (последний абзац) представлены интересные соображения автора, касающиеся свойств мутанта инфестина-4, которые он называет ограничениями диссертации. В действительности здесь квалифицированно описаны перспективы дальнейших исследований по теме диссертации. (2) В таблице 11 приведены расчетные значения так называемой оценочной функции докинга, которые предназначены для предсказания эффективности связывания фактором XIIIa ряда ингибиторов. К сожалению, в таблице и тексте отсутствуют пояснения конкретного физического смысла этой функции, не описан алгоритм сравнения ее значений с константами ингибирования. (3) В обзоре литературы (стр. 10), где рассматривается роль фибриногена и фибрина в агрегации тромбоцитов, имеется неадекватная ссылка ([5]) на публикацию других авторов. В этой работе фибриноген или фибрин не были предметом исследования. (4) На рисунке 17 по оси ординат имеется текст: «Поглощение разбавленного надосадка клеток». Хотелось бы обратить внимание, что слово «Поглощение» означает процесс, а не количественную величину.

Все сделанные замечания не носят принципиального характера, не ставят под сомнение обоснованность основных положений, результатов и выводов диссертационной работы.

Заключение.

По своему объему, содержанию и значимости полученных результатов диссертационная работа В.Н. Колядко «Механизмы избирательного ингибирования контактного пути свертывания крови каноническими ингибиторами» является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором решается актуальная научная задача в области биофизики свертывания крови. Данная работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства

РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор В.Н. Колядко заслуживает присвоения ему искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

04 апреля 2017 г.

Профессор кафедры общей и медицинской биофизики медико-биологического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России,

д.б.н., профессор



Рощупкин Д.И.

Адрес: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

Тел.: 8(495)434-47-10

E-mail: roshchupkin_di@rsmu.ru

Подпись д.б.н., проф. Рощупкина Д.И. заверяю.

Ученый секретарь ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России,

д.м.н., доцент Милушкина Ольга Юрьевна

