

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель генерального директора по научной  
работе,  
Директор института экспериментальной  
кардиологии,  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения «Российский  
кардиологический научно-производственный  
комплекс»  
Министерства здравоохранения Российской  
Федерации,  
д.м.н., профессор С.Н. Терещенко



«27»

марта 2017 г.

М.П.

### ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу **Подоплеловой Надежды Александровны** «Взаимодействие факторов свертывания крови с субпопуляциями активированных тромбоцитов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности биофизика – 03.01.02

**Актуальность темы исследований.** Изучение механизмов свертывания крови ведется уже много десятилетий и не теряет своей актуальности, так как нарушения в данной системе организма человека ведет к серьезным, вплоть до смерти, последствиям. В состав системы свертывания (коагуляции) крови входят многочисленные факторы и их кофакторы, конечным итогом работы которых является образование нерастворимого фибринового сгустка. Таким образом, эта система участвует в процессах гемостаза (остановки кровотечений) при нарушении целостности сосудов и внутрисосудистого тромбообразования при их внутреннем патологическом повреждении. Кроме системы свертывания крови в этих процессах участвуют также тромбоциты, которые прикрепляются к поврежденным участкам сосудов и образуют агрегаты, составляющие первичную основу, как гемостатической пробки

и внутрисосудистых тромбов. Система коагуляции крови и тромбоциты функционирует совместно, оказывая взаимное влияние друг на друга. Тромбин – центральная протеаза системы свертывания, кроме того, что катализирует превращение фибриногена в фибрин, является одним из мощнейших активаторов тромбоцитов. Активированные тромбоциты в свою очередь секретуют из гранул некоторые компоненты коагуляционного каскада, повышая их локальную концентрацию в зоне повреждения сосудов. Одной из важнейших прокоагулянтных реакций тромбоцитов является предоставление мембранной поверхности, содержащей отрицательно заряженные фосфолипиды (в первую очередь фосфатидилсерин) для сборки коагуляционных комплексов. Еще в начале 2000х годов было показано, что при активации тромбоциты делятся на две субпопуляции, отличающиеся по своим свойствам. По имеющимся данным, только одна из субпопуляций способна связывать факторы свертывания и поддерживать мембранно-зависимые реакции коагуляционного каскада. Однако, детальных исследований взаимодействия факторов свертывания с мембранами тромбоцитов данной субпопуляции не проводилось.

Диссертационная работа Н. А. Подоплеловой посвящена исследованию взаимодействия факторов свертывания крови с активированными тромбоцитами с учетом их деления на субпопуляции. Проведенное в работе исследования являются актуальными и представляют несомненный интерес для понимания механизмов работы мембранно-зависимых реакций свертывания, а полученные результаты в дальнейшем могут быть использованы для разработки новых подходов диагностики и лечения нарушений гемостаза и тромботических патологий.

**Цель диссертационной работы** заключалась в характеристике взаимодействия факторов свертывания крови с мембранами активированных тромбоцитов с учетом их деления на субпопуляции.

Для достижения указанной цели были 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.

**Основное содержание работы.** Диссертационная работа Подоплеловой Н.А. имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и

методов, результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов, и списка цитируемой литературы, включающего 128 наименований.

Во введении достаточно аргументировано изложен выбор основного направления и объектов исследования, экспериментальных методов и способов анализа полученных результатов. Кроме того, обоснована актуальность изучения механизмов мембранно-зависимых реакций свертывания крови.

**Глава 1** («Обзор литературы») носит аналитический характер и содержит описание современных представлений о гемостазе, механизмах мембранно-зависимых реакций, структуре, функциях и роли в свертывании крови тромбоцитов. Обзор демонстрирует высокую компетентность автора в данной области. Опираясь на литературные данные, автор подчеркивает актуальность исследования механизмов мембранно-зависимых реакций свертывания крови, и в частности ключевого этапа любой мембранно-зависимой реакции – взаимодействия белка с мембраной.

В **Главе 2** приведено подробное описание использованных соискателем объектов исследования, методик анализа и проведения эксперимента. Автором освоены и использованы такие разные и современные методы исследования, как проточная цитофлуориметрия, различные варианты микроскопии, поверхностный плазмонный резонанс и др.

Результаты экспериментов представлены в **Главе 3**. В первом разделе данной главы проведено детальное исследование особенностей взаимодействия факторов X и Xa с мембранами как активированных тромбоцитов, так и искусственных фосфолипидных везикул. В результате проведенного исследования были определены количественные параметры взаимодействия факторов X и Xa с фосфолипидными везикулами и активированными тромбоцитами. Было показано, что факторы X и Xa преимущественно связываются с фосфатидилсерин-положительными тромбоцитами, при этом связывание обратимое и  $Ca^{2+}$ -зависимое. Важным результатом является то, что диссоциация факторов с мембраны представляет собой двустадийный процесс. Первая стадия достаточно быстрая, в первые пять минут наблюдается диссоциация 30-50% связавшегося фактора. Вторая стадия медленная, в ходе нее достигается плато, которое находится значительно выше, чем можно было бы предположить из экспериментов по равновесному связыванию. То есть связанный фактор состоит из двух фракций одна из которых связана обратимо, другая – необратимо. В экспериментах в проточных камерах автором показано, что подобное закрепление факторов на мембране тромбоцитов может препятствовать их вымыванию из тромбоцитарного тромба в условиях потока. Автор, опираясь на существующие литературные данные, предполагает,

что такое поведение факторов связано с их мультимеризацией при связывании с мембраной. Однако, напрямую в рамках данной работы данное предположение подтверждено не было. Отдельно стоит отметить широкий круг методов, используемый в ходе работы. Процесс ассоциации –диссоциации факторов был детально исследован с помощью проточной цитометрии, поверхностного плазмонного резонанса, а также в проточных камерах с помощью конфокальной микроскопии.

Во втором разделе данной главы охарактеризовано связывание фактора XII с тромбоцитами. В результате проведенных исследований было выявлено, что фактор XII связывается с активированными тромбоцитами значительно лучше, чем с неактивированными, при чем избирательно с фосфатидилсерин-положительной субпопуляцией. Связывание необратимое,  $Ca^{2+}$ -независимое, и не имеет насыщения в диапазоне концентраций фактора XII от 0 до 1 мкМ.

Третий раздел главы посвящен пространственному распределению факторов свертывания на мембранах активированных тромбоцитов. В данной работе было впервые показано, что факторы свертывания неравномерно распределены на мембранах фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов. Наблюдается регион, в котором локальная концентрация факторов в несколько раз выше, чем на остальной мембране тромбоцита. При этом напрямую показано, что такая локализация факторов может приводить к ускорению мембранно-зависимых реакций свертывания до 50 раз.

Таким образом, в ходе выполнения данной работы автором получены важные и оригинальные данные, позволяющие лучше разобраться в механизмах мембранно-зависимых реакций свертывания крови. В частности объясняются механизмы предотвращающие вымывание потоком факторов свертывания из тромбоцитарных тромбов, а также механизмы ускорения мембранно-зависимых реакций.

Далее в **Главе 4** приводится обсуждение полученных результатов, их сравнение с ранее опубликованными данными, а также обсуждаются перспективы их практического применения. Из этого раздела становится очевидным, что результаты, представленные в работе, отличает оригинальность и научная новизна. Дополнительно подчеркиваются преимущества и ограничения проведенного исследования.

Небольшой раздел «**Заключение**» суммирует полученные в работе основные результаты. **Выводы** работы полностью соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

Резюмируя все вышесказанное, можно выделить следующие основные положительные качества диссертации. Работа выполнена на хорошем экспериментальном уровне с

использованием современных методов исследования, таких как проточная цитометрия, конфокальная и электронная микроскопия, поверхностный плазмонный резонанс. Достоверность полученных результатов подтверждена адекватной статистической обработкой многократных измерений. Основные положения и результаты работы опубликованы в профильных журналах рекомендованных ВАК и многократно докладывались на российских и международных конференциях.

В целом, диссертация написана хорошим языком с необходимой степенью детализации и аргументированности. Представленный в ней иллюстративный материал нагляден и удобен для восприятия. Тем не менее, представление материала и оформление рукописи не лишено ряда недостатков. В тексте встречаются некоторые неясности, стилистические неточности, опечатки, пропуски интервалов между словами. В разделе «Обзор литературы», автор пишет, что феномен разделения тромбоцитов на субпопуляции был принят только к 2010 г. Однако непонятно почему это произошло – были ли, например, получены доказательства существования субпопуляций тромбоцитов в условиях *in vivo* или *ex vivo*. Иногда в рукописи использованы не совсем удачные и корректные термины – например, «выбрасывание» и/или «секреция» гранул. Но выбрасывается и секретруется содержимое гранул, а сами гранулы сливаются с плазматической мембраной тромбоцитов. Также неудачным является термин «тромбоцитарная бляшка» (термин бляшка обычно относится к атеросклеротической терминологии), и некоторые другие. Однако количество неточностей и опечаток невелико и эти недостатки имеют чисто формальный, редакторский характер и никак не влияют на научную ценность полученных в диссертации результатов. Их достоверность, новизна и практическая значимость для биомедицинских приложений не вызывают сомнений. Содержание диссертации с достаточной полнотой и точностью отражено в автореферате.

По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе статей в отечественных и международных журналах, рекомендованных ВАК РФ и включенных в базу цитирования Web of Science (включая такие высокорейтинговые журналы, как «Blood» и «Journal of Biological Chemistry»), а также тезисов докладов на конференциях различного уровня.

Давая общую оценку диссертации Н.А. Подоплеловой, можно заключить, что она представляет собой законченную научно-квалификационную работу, содержащую решение актуальной проблемы – взаимодействие факторов свертывания с разными субпопуляциями активированных тромбоцитов. Выводы, сделанные на основании полученных автором данных, отвечают поставленным задачам, а автореферат соответствует содержанию

диссертации. Диссертационная работа Н.А. Подоплеловой удовлетворяет 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, а ее автор заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Настоящий отзыв обсужден и принят на научном межлабораторном семинаре Института экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Присутствовало на семинаре 15 человек. Результаты голосования: «за» – 15 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет, протокол № 1 от 18 марта 2017 г. Составитель отзыва – ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной адгезии Института экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения Российской Федерации д.б.н. Бурячковская Людмила Ивановна.



\_\_\_\_\_  
(Л.И. Бурячковская)

121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а  
Тел. +7 (499) 140-93-36  
E-mail: info@cardioweb.ru