

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по образовательной деятельности
Федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего
образования «Казанский (Приволжский)
федеральный университет»,
д.ф.-м.н., проф. Таюрский Д.А.



2017 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Института фундаментальной медицины и биологии
Федерального государственного автономного образовательного учреждения
высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
(ФГАОУ ВО КФУ) о диссертационной работе **Колядко Владимира
Николаевича** «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 исследований

Диссертационная работа Колядко В.Н. посвящена исследованию
механизмов избирательного ингибирования фактора XIIa контактного пути

свертывания белковыми ингибиторами, относящимися к классу канонических. Актуальность работы объясняется тем, что активация свертывания по контактному пути является одним из пусковых механизмов развития тромбоза. При контакте крови с чужеродными материалами, например, катетерами, искусственными клапанами сердца и стентами, на их поверхности адгезируют (прилипают) тромбоциты, и на ней же активируется фактор XIIa контактного пути свертывания крови. В результате запускается цепочка реакций, приводящих к образованию тромбина – главного фермента системы свертывания, который превращает растворимый фибриноген плазмы в нерастворимый фибриновый гель и является главным активатором тромбоцитов. Фибрин прикрепляется к активированным тромбоцитам через интегринальный рецептор, образуя тромбоцитарно-фибриновую сеть, которая является основой окклюзивного тромба. После образования тромба происходит его контракция (сжатие), из-за чего нарушенный кровоток может частично восстановиться. Тромбоз и сопутствующее нарушение мозгового кровообращения могут вызывать ишемический инсульт, который является одной из главных причин смертности и инвалидности в мире. В развитии ишемического инсульта играют роль как нарушения плазменного и сосудистого гемостаза, так и повышенная активация тромбоцитов. Несмотря на широкий круг работ, патогенез этого заболевания до сих пор не ясен, а результаты профилактики или лечения являются неудовлетворительными, в том числе из-за того, что препараты, основанные на инактивации тромбина и подавляющие образование тромба, достаточно часто могут провоцировать угрожающие жизни кровотечения. В то же время, ингибиторы фактора XIIa могут стать основой для нового класса препаратов, не вызывающих побочных эффектов в виде кровотечений.

Основное содержание работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения собственных результатов,

обсуждения, заключения, выводов, благодарностей и списка цитируемой литературы (186 источников). Работа изложена на 135 страницах и содержит 44 рисунка и 12 таблиц.

В **обзоре литературы** (Глава 1) соискатель последовательно изложил и проанализировал современные представления о системе свертывания крови с акцентом на контактный путь свертывания, данные об ингибиторах фактора XIIa и их практическом значении, общие механизмы действия канонических ингибиторов протеаз. Обзор заканчивается формулировкой проблем, которые возникают при создании избирательных ингибиторов фактора XIIa.

При описании **материалов и методов** (Глава 2) соискатель подробно изложил методическую часть работы, связанную с получением рекомбинантных ингибиторов, измерением их ингибирующей активности, оценкой их влияния на время свертывания, кинетику генерации тромбина, пространственную динамику фибринового сгустка при активации свертывания по внутреннему или внешнему пути. Также достаточно детально описаны методики моделирования молекулярной динамики ингибиторов и белок-белкового докинга, процедуры выделения тромбоцитов и изучения формирования их субпопуляций в присутствии ингибиторов трансглутаминаз.

В Главе 3 приведены собственные **результаты** соискателя. Основным результатом экспериментальных исследований является выявление замен аминокислот в протеаза-связывающей петле инфестине-4, вследствие чего селективность этого ингибитора к фактору XIIa возрастает в 100 раз. На основе проведенных исследований сделан вывод, имеющий важное теоретическое и практическое значение, о том, что повышение селективности ингибирования фактора XIIa связано с изменениями в аминокислотном составе и конформации протеаза-связывающей петли инфестина-4. Взаимодействия мутированного ингибитора с нецелевыми протеазами при этом уменьшается. Соискателем убедительно показано, что применение такого ингибитора позволяет достичь высокоспецифического ингибирования контактного пути свертывания в плазме

и цельной крови. Важность этого результата для практики заключается в том, что использование ингибитора на основе инфестина-4 не только позволит избавиться от артефактов контактной активации и тем самым усовершенствовать проведение исследований системы свертывания, но и, возможно, понизит тромбогенность материалов и создать новое безопасное лекарство для профилактики тромбозов.

При **обсуждении** результатов (Глава 4) соискатель приводит анализ полученных результатов, сопоставляет экспериментальные данные с результатами вычислений, сравнивает собственные результаты с данными литературы и описывает перспективы использования результатов работы. Более того, заслуживает высокой оценки тот факт, что при обсуждении отмечены как преимущества проведенного исследования, так и его ограничения.

Достоверность, новизна и значимость результатов и выводов

Достоверность результатов, полученных в работе В. Н. Колядко, обеспечена использованием адекватных экспериментальных и теоретических подходов к исследованию белковых ингибиторов свертывания, современных биофизических, биохимических и молекулярно-биологических методов исследования, большим объемом экспериментальных данных, сопоставлением данных, которые были получены соискателем различными экспериментальными и теоретическими методами, с известными данными из литературы.

Научная новизна заключается в выяснении механизма действия нового ингибитора на основе инфестина-4 на систему свертывания крови. Практическая ценность заключается в создании нового, высоко избирательного ингибитора фактора XIIa, который может быть использован для повышения качества манипуляций, проводимых с кровью *in vitro*, и для улучшения лабораторной диагностики гемостаза, что подтверждается двумя патентами на изобретение, в которых соискатель является автором.

Полученные результаты являются новыми, приоритетными и оригинальными. Анализ результатов свидетельствует об их достоверности, научной новизне и практической значимости; научные положения и выводы, сформулированные в работе, убедительны и полностью обоснованы.

Вопросы и замечания

Принципиальных замечаний по работе не имеется. В работе встречаются стилистические погрешности, а также пунктуационные и орфографические ошибки. Ниже приведены вопросы и пожелания, возникшие после ознакомления с работой:

1. При описании метода исследования генерации тромбина было бы желательно сравнить использованный вариант метода с широко принятым коммерческим автоматизированным методом, предложенным Coenrad Hemker на основе тромбограммы.
2. При анализе данных, опубликованных в литературе об инфестине-4 и других доменах белка инфестина (Таблица 3; с. 29), в главе 1.4.1. стоило обсудить физиологическую роль, которую играют эти ингибиторы в пищеварительном тракте *Triatoma infestans*. Хотя вопрос о биологической целесообразности является спорным, есть ли объяснение, зачем насекомым, питающимся кровью млекопитающих, нужен не только ингибитор тромбина (инфестин-1), но и ингибитор фактора XIIIa и ингибитор плазмина (инфестин-4)?
3. Не достаточно глубоко обсужден результат, показанный на Рисунке 22 (с. 80), – почему наибольшей активностью обладает такой вариант тыквенного ингибитора СМТИ-III, который содержит полигистидиновый хвост только на N-конце, почему ингибирующая активность снизится на порядок, если этот хвост поместить на C-конце ингибитора?
4. Если тромбоциты получались гель-фильтрацией, откуда брался фибриноген, который автор обнаруживал на поверхности активированных тромбоцитов? Если фибриноген присутствовал в препаратах тромбоцитов, почему он не свертывался при добавлении тромбина?

5. Каков механизм экспрессии фосфатидилсерина на поверхности тромбоцитов под действием тканевой трансглутаминазы? Каково патогенетическое значение тканевой трансглутаминазы, в отличие от плазменной трансглутаминазы, при тромбозе?

Высказанные замечания и вопросы ни в коей мере не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы как квалификационного научного труда высокого уровня и не ставят под сомнение обоснованность ее основных положений и выводов.

Заключение


Диссертационная работа Колядко В.Н. выполнена по актуальной теме с привлечением широкого набора современных методов исследования. Полученные в работе результаты являются новыми и достоверными. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации, в нем отражены главные идеи исследования и представлены научные выводы. Результаты работы следует рекомендовать к использованию в организациях, занимающихся исследованиями в области биофизики, биохимии, молекулярной биологии, гематологии и гемостазиологии.

Давая общую оценку диссертации В. Н. Колядко, можно заключить, что она представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение важной для развития биофизики и ряда смежных областей задачи по изучению специфичности действия ингибиторов контактного пути свертывания. Диссертационная работа В. Н. Колядко 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. По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 5 статей в российских и международных журналах, входящих в перечень ВАК, патентов

на изобретения и тезисов докладов на конференциях различного уровня. Автор диссертации Колядко Владимир Николаевич заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Настоящий отзыв обсужден и принят на научном семинаре сотрудников научно-исследовательской лаборатории «Белково-клеточные взаимодействия» Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО КФУ. Присутствовало на заседании 10 человек. Результаты голосования: «за» – 10 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет, протокол № 2 от 14 марта 2017 г.

Составитель отзыва Литвинов Рустем Игоревич, доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии и биотехнологии, руководитель научно-исследовательской лаборатории «Белково-клеточные взаимодействия» Института фундаментальной медицины и биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет».


_____ (Р.И. Литвинов)

Адрес: 420008, Россия, РТ, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18. Т.: +7 (843) 233-71-09. E-mail: litvinov@mail.med.upenn.edu

