

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

о соответствии диссертационной работы «Взаимодействие факторов свертывания крови с субпопуляциями активированных тромбоцитов» Подоплеловой Надежды Александровны профилю диссертационного совета Д 002.039.01 и требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям

Комиссия в составе д.б.н. Каламкарова Г.Р. (председатель комиссии), д.б.н., проф., Пальминой Н.П., д.б.н. Дудник Л.Б.– констатирует, что диссертационная работа «Взаимодействие факторов свертывания крови с субпопуляциями активированных тромбоцитов» по теме, постановке задач, методам исследования и полученным результатам соответствует специальности 03.01.02 – биофизика (биологические науки).

Комиссия отмечает следующие **основные научные результаты** диссертационной работы и ее **новизну**:

В диссертационной работе Подоплеловой Н.А. было охарактеризовано взаимодействие факторов свертывания с мембранами активированных тромбоцитов и искусственных фосфолипидных везикул, а для факторов X и Xa были определены количество сайтов связывания, равновесные константы диссоциации, константы скорости ассоциации и диссоциации. Впервые показано, что связанные факторы X и Xa состоят из двух фракций, только одна из которых может свободно диссоциировать. Это явление вызвано олигомеризацией факторов X и Xa при взаимодействии с отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами.

В данной работе впервые охарактеризовано распределение факторов свертывания IXa, Xa, X, V / Va, VIII / VIIIa, протромбина, а также аннексина V на мембранах активированных тромбоцитов из разных субпопуляций. Показано, что факторы свертывания локализованы в небольшой области мембраны фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов, где их средняя концентрация в несколько раз выше, чем на остальной мембране тромбоцитов. Подобная локализация может приводить к ускорению мембранно-зависимых реакций свертывания крови до 50 раз.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа Подоплеловой Н. А. представляет собой цельное и хорошо структурированное научное исследование, выполненное на высоком экспериментальном уровне. Работа выполнена на надежном оборудовании с использованием стандартных методик, ранее апробированных в работах других исследователей.

Взаимодействие факторов свертывания X и Xa было количественно охарактеризовано с применением метода проточной цитофлуориметрии и подтверждено методом поверхностного плазмонного резонанса, классическим методом изучения белок-мембранного взаимодействия.

Для исследования распределения факторов свертывания на тромбоцитах был использован метод конфокальной микроскопии. Ультраструктура активированных тромбоцитов была исследована методами трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии. Данные методы позволили детально визуализировать и провести полную 3D реконструкцию тромбоцита.

Все полученные в работе результаты подробно обсуждены с привлечением современных научных работ отечественных и зарубежных авторов. Научные положения и выводы диссертации Подоплеловой Н.А. обоснованы, достоверны и логически вытекают из полученных экспериментальных данных.

Практическая и научная значимость результатов диссертационной работы

Из результатов работы следует, что при связывании с отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами факторы X и Xa могут образовывать олигомеры, диссоциирующие медленнее, чем мономеры, что предотвращает вымывание потоком крови факторов из растущего тромба.

Показано, что факторы свертывания преимущественно сконцентрированы в небольшой области мембраны тромбоцитов, что приводит к ускорению реакции активации фактора X комплексом внутренней теназы и способствует 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.

Основные результаты диссертационной работы изложены в статьях автора, опубликованных в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. Podoplelova, N.A. Coagulation factors bound to procoagulant platelets are concentrated in their cap structures to promote clotting / Podoplelova, N.A., Sveshnikova, A. N., Kotova, Y. N., Eckly, A., Receveur, N., Nechipurenko, D. Y., Obydennyi, S. I., Kireev, I. I., Gachet, C., Ataulakhanov, F. I., Mangin, P. H., Panteleev, M. A. // Blood. – 2016. – Vol. 128. – № 13. – P. 1745-1755

2. Podoplelova, N.A. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to procoagulant activated platelets and phospholipids results from multistep association and membrane-dependent multimerization / Podoplelova, N.A., Sveshnikova, A. N., Kurasawa, J. H., Sarafanov, A. G., Chambost, H, Vasil'ev, S. A., Demina, I. A., Ataulakhanov, F. I., Alessi, M. C., Panteleev, M. A. // Biochim Biophys Acta. – 2016 – Vol. 1858. – P. 1216-1227.

3. Подоплелова, Н.А. Регуляция мембранно-зависимых реакция свертывания крови / Подоплелова Н.А., Котова Я. Н., Липец Е. Н., Атауллаханов Ф. И., Пантелеев М. А. // Успехи физиологических наук. – 2015. – Т. 46. – №4. – С. 3-14.

4. Кумскова, М.А. Диагностика тромбастении Гланцмана с помощью исследования показателей плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза. / Кумскова М.А., Дёмина И.А., Подоплелова Н.А., Баландина А.Н., Серёгина Е.А., Бондар Е.В., Полетаев А.В., Коняшина Н.И., Пантелеев М.А. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2015. – Т. 14 – №4. – С. 17–24

5. Zakharova, N.V. Platelet surface-associated activation and secretion-mediated inhibition of coagulation factor XII. / Zakharova N.V., Artemenko E.O., Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Demina I.A., Ataulakhanov F.I., Pantelev M.A. // PLoS One – 2015. – Vol.10. – №2, – P. e0116665

6. Abaeva, A.A. Procoagulant platelets form an alpha-granule protein-covered “cap” on a surface that promotes attachment to aggregates / A.A.Abaeva, M.Canault, Y.N.Kotova, S.I.Obydennyu, A.O.Yakimenko, N.A.Podoplelova, V.N.Kolyadko, H.Chambost, A.V.Mazurov, F.I.Ataullakhanov, A.T.Nurden, M.-C.Alessi, M.A.Pantelev // The Journal of Biological Chemistry. – 2013. – Vol. 288. – P. 29621–29632

7. Кудрявцев, К.В. Ингибирование прокоагулянтной активности тромбоцитов крови винилсульфонилпроизводными пирролидин-2-карбоновой кислоты. / Кудрявцев К.В., Подоплелова Н.А., Новикова А.А., Пантелеев М.А., Заболотнев Д.В., Зефилов Н.С. // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2011. – №4. – С. 665-670

Помимо вышеуказанного, автором опубликованы тезисы 9 докладов на российских и международных конференциях.

Публикации основных научных результатов диссертации соответствуют требованиям пунктов 11 и 13 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748).

Диссертация Подоплеловой Н.А. отвечает требованиям пункта 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748). Диссертация не содержит заимствованных материалов и результатов без ссылок на авторов и источники заимствования. В диссертации даны ссылки на результаты работ, выполненных Н.А. Подоплеловой в соавторстве с Абаевой (Новиковой) А.А., Артеменко Е.О., Атауллахановым Ф.И., Баландиной А.Н., Бондар Е.В., Васильевым С.А., Дёминой И.А., Заболотневым Д.В., Захаровой Н.В., Зефиловым Н.С., Киреевым И.И., Колядко В.Н., Коняшиной Н.И., Котовой Я.Н., Кудрявцевым К.В., Кумсковой М.А., Липец Е.Н., Мазуровым А.В., Нечипуренко Д.Ю., Обыденным С.И., Пантелеевым М.А., Полетаевым А.В., Сарафановым А.Г., Свешниковой А.Н., Серёгиной Е.А., Якименко А.О., Alessi M.-C., Canault M., Chambost H., Eckly A., Gachet C., Kurasawa J.H., Mangin P.H., Nurden A.T., Receveur N.

На основании вышеизложенного комиссия рекомендует диссертационному совету Д 002.039.01 принять к защите диссертационную работу Подоплеловой Надежды Александровны «Взаимодействие факторов свертывания крови с субпопуляциями активированных тромбоцитов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Комиссия рекомендует утвердить в качестве официальных оппонентов:

- доктора биологических наук **Холмухамедова Эхсона Лукмановича**, ведущего научного сотрудника лаборатории тканевой инженерии Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук;
- доктора медицинских наук, профессора **Литвинова Рустама Игоревича**, профессора кафедры биохимии и биотехнологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета.

В качестве ведущей организации – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Председатель комиссии:
д.б.н.



Каламкаров Г.Р.

Члены комиссии:

д.б.н., профессор



Пальмина Н.П.

д.б.н.



Дудник Л.Б.