



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской
академии наук
(ЦТП ФХФ РАН)

«03» октября 2016 г. Москва, 119991, ул. Косыгина 4, т. (495) 938-25-33
№ 9

УТВЕРЖДАЮ

Директор ЦТП ФХФ РАН,
д.б.н., проф. Ф.И. Атауллаханов



М.П.

**ВЫПИСКА
ИЗ ПРОТОКОЛА ЗАСЕДАНИЯ
УЧЕНОГО СОВЕТА ЦТП ФХФ РАН**

От "03" октября 2016 г. № 9

Председатель: д.б.н. Атауллаханов Фазоил Иноятович
Ученый секретарь совета: к.б.н. Баландина Анна Николаевна

ПОВЕСТКА ДНЯ

Обсуждение диссертационной работы Подоплеловой Надежды Александровны «Взаимодействие факторов свертывания крови с субпопуляциями активированных тромбоцитов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

ПРИСУТСТВОВАЛИ:

Члены Ученого совета Центра в количестве 16 человек из 18, входящих в состав Ученого совета, а также научные сотрудники Центра

СЛУШАЛИ:

Доклад по диссертационной работе Подоплеловой Надежды Александровны «Взаимодействие факторов свертывания крови с субпопуляциями активированных тромбоцитов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Вопросы заданные докладчику:

д.б.н. Е.И. Синауридзе: Была ли проанализирована кинетика связывания и диссоциации для фактора IX?

Н. А. Подоплелова: Нет, в рамках данной работы детально охарактеризовано только связывание факторов X/Xa. Для фактора IX было изучено только его пространственное распределение.

к.ф.-м.н С.А. Кузнецова: каким образом была проведена калибровка и рассчитано количество сайтов связывания для факторов?

Н. А. Подоплелова: для калибровки проточных цитофлуориметров и конфокального микроскопа были использованы калибровочные полистироловые шарики с известным количеством молекул флуорофора на шарик. Была построена кривая зависимости средней флуоресценции шариков от количества молекул флуорофора на них. С помощью данной кривой проводили пересчет средней флуоресценции тромбоцитов в количество молекул флуорофора, а затем, зная степень меченья факторов, и в количество молекул фактора на тромбоцит.

к.б.н. Баландина А. Н. Оценивалась ли функциональная активность олигомеров фактора Xa?

Н. А. Подоплелова: Нет, мы не оценивали функциональную активность олигомеров фактора Xa. Однако, в литературе есть данные, что димеры фактора Xa функционально не активны в отличие от мономеров.

к.б.н. Липец Е. Н. На микрофотографиях видно, что фактор Xa связывается не только с фосфатидилсерин-положительными тромбоцитами, но и со всем объемом тромба. Чем это вызвано?

Н. А. Подоплелова: из литературы известно, что фактор Va, выступает высокоаффинным сайтом связывания для фактора Xa. Именно связыванием с фактором Va можно объяснить наличие фактора Xa по всему объему тромба, а не только на фосфатидилсерин-положительных тромбоцитах.

ВЫСТУПИЛИ:

Д.ф.-м.н. Пантелеев М.А. сообщил, что молодой специалист Подоплелова Н. А. участвовала в международных и отечественных конференциях, имеет публикации в рецензируемых журналах и является перспективным молодым ученым. Подоплелова Н. А. удовлетворяет требованиям, предъявляемым к соискателям ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Открытым голосованием единогласно принято решение рекомендовать кандидатуру Подоплеловой Н. А. на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

ПОСТАНОВИЛИ:

1. Утвердить Заключение ЦТП ФХФ РАН по диссертационной работе Н.А. Подоплеловой (прилагается)
2. Рекомендовать работу Подоплеловой Надежды Александровны к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии
Российской академии наук
на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.02 – биофизика.

Диссертация «Взаимодействие факторов свертывания крови с субпопуляциями активированных тромбоцитов» выполнена Подоппеловой Надеждой Александровной в лаборатории молекулярных механизмов гемостаза Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН).

В 2010 году Подоппелова Н. А. окончила биологический факультет Вятского государственного университета с присуждением квалификации инженер по специальности «Биотехнология»

С 01.03.2011 по 28.02.2014 гг. Подоппелова Н. А. проходила обучение в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук в лаборатории молекулярных механизмов гемостаза.

С августа 2013 г. и по настоящее время работает в «Национальном научно-практическом центре детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения России.

Удостоверение № 35 о сдаче кандидатских экзаменов выдано 24.12.2013 г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Центром теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук

Научный руководитель: Пантелеев Михаил Александрович, доктор физико-математических наук, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярных механизмов гемостаза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук. Научный руководитель и тема диссертационной работы утверждены решением Ученого совета ЦТП ФХФ РАН от 10.10.2013 г., Протокол № 7.

По итогам обсуждения диссертации «Взаимодействие факторов свертывания крови с субпопуляциями активированных тромбоцитов» принято следующее заключение:

Оценка выполненной работы. Диссертация Подоппеловой Н. А. является научно-квалификационной работой, посвященной изучению взаимодействия факторов свертывания крови с активированными тромбоцитами. Получение этих данных важно для создания подходов к диагностике и лечению сердечно-сосудистых заболеваний. Работа отвечает требованиям, предъявляемым ВАК России к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Актуальность работы

Детальные фундаментальные исследования системы гемостаза являются ключевым звеном разработки новых подходов к диагностике и лечению сердечно-сосудистых заболеваний. Гемостаз человека обеспечивается сложным взаимодействием сосудистой стенки,

тромбоцитов и белков свертывающей системы плазмы крови, происходящим в условиях потока. Реакции свертывания крови протекают на поверхности клеток: активация происходит на поверхности фибробластов, далее ключевую роль играют реакции каскада плазменного свертывания на поверхности активированных тромбоцитов. Первым шагом любой мембранно-зависимой реакции является связывание белка с фосфолипидной мембраной. Понимание этого шага критически важно для анализа механизмов ускорения реакций свертывания.

Наиболее существенные результаты, полученные соискателем

В данной работе всесторонне и полно охарактеризовано взаимодействие факторов свертывания X и Xa с мембранами активированных тромбоцитов и искусственных фосфолипидных везикул. Одним из основных результатов является то, что связывание факторов – это многоступенчатый процесс, в ходе которого могут образовываться различные олигомеры факторов X/Xa. Данные олигомеры прочнее связаны с мембраной и хуже диссоциируют, чем мономеры. В реальных тромбах это явление может предотвращать вымывание факторов потоком. Другим важным результатом является то, что факторы не равномерно распределены на мембране тромбоцитов, а сконцентрированы в небольшой области. Такое распределение может способствовать значительному ускорению мембранных реакций, обеспечивая быстрый рост тромба в условиях потока.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации.

Все результаты, представленные в диссертационной работе, получены при личном участии автора. Все работы по исследованию связывания факторов свертывания X и Xa с активированными тромбоцитами, сравнение распределения факторов свертывания на мембранах активированных тромбоцитов с учетом их деления на субпопуляции и изучение распределения факторов свертывания на поверхности тромбоцитов при формировании тромбоцитарного тромба в проточной камере, а также написание статей и тезисов конференций по материалам диссертации проводились либо лично автором, либо при непосредственном участии автора.

Степень достоверности результатов проведенных исследований.

Для исследования взаимодействия факторов X/Xa с фосфолипидными везикулами и активированными тромбоцитами использовался метод проточной цитофлуориметрии. Пересчет интенсивности флуоресценции в количество молекул фактора на тромбоцит проводили с использованием калибровочных полистироловых шариков с известным количеством молекул флуорофора на шарик. Кроме того, полученные данные были подтверждены методом поверхностного плазмонного резонанса. Данный метод не требует маркировки белка и является современным высокочувствительным методом для изучения белок-мембранного взаимодействия.

Взаимодействие фактора Xa с тромбоцитарным тромбом в условиях потока исследовали в плоско-параллельных проточных камерах методом конфокальной микроскопии. Результаты данных экспериментов показали, что фактор Xa не полностью вымывается из тромбов в условиях потока.

Для исследования распределения факторов свертывания на мембранах активированных тромбоцитов использовали метод конфокальной микроскопии. Это позволило показать, что факторы не равномерно распределены на мембране тромбоцитов, а сконцентрированы в небольшой области. Для количественной оценки связывания факторов с прокоагулянтными

тромбоцитами была проинтегрирована интенсивность флуоресценции факторов в регионе с их повышенной концентрацией и на остальной поверхности тромбоцита. Для пересчета интенсивности флуоресценции в количество молекул фактора на тромбоцит использовали полистироловые шарики с известным количеством молекул флуорофора на шарик. Кроме того, была проведена оценка размеров региона с повышенной концентрацией факторов и всего тромбоцита.

Для исследования ультраструктуры активированных тромбоцитов были использованы методы трансмиссионной электронной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии с фокусированным ионным пучком. Данные методы позволили детально визуализировать и провести полную 3D реконструкцию тромбоцита.

Научные положения и выводы диссертации Подоплеловой Н.А. обоснованы, достоверны и логически вытекают из полученных экспериментальных данных.

Научная новизна. В диссертационной работе Подоплеловой Н. А. количественно охарактеризовано связывание факторов X и Xa с субпопуляциями активированных тромбоцитов и искусственными фосфолипидными везикулами. Впервые обнаружено, что взаимодействие факторов X и Xa с фосфолипидными мембранами — многостадийный процесс, который не может быть описан классической моделью обратимого одношагового связывания: связанные с мембраной факторы X и Xa состоят из двух фракций, только одна из которых может свободно диссоциировать. Кроме того, выявлено, что механизмы закрепления на мембране для факторов X и Xa различаются. Для фактора Xa основную роль играет мультимеризация, в том числе могут образовываться гетеромультимеры факторов X и Xa, которые хуже диссоциируют с мембраны, чем мономеры. Закрепление фактора X на фосфолипидной мембране происходит за счет его стабилизации. Мультимеризация фактора Xa может препятствовать его вымыванию из тромба в условиях потока. Охарактеризовано распределение факторов свертывания IXa, Xa, X, V / Va, VIII / VIIIa, протромбина, а также аннексина V на мембране ФС-положительных тромбоцитов. Показано, что данные факторы и аннексин V в основном локализованы в небольшой области мембраны, где их средняя концентрация выше в несколько раз. Подобное концентрирование факторов может приводить к ускорению до 50 раз реакции активации фактора X комплексом внутренней теназы.

Научно-практическая значимость работы. В результате данной работы получены новые уникальные данные по механизмам взаимодействия факторов свертывания с фосфолипидными мембранами, которые могут применяться для разработки новых подходов к диагностике и лечению сердечно-сосудистых заболеваний.

Ценность научных работ соискателя, соответствие содержания диссертации специальности, полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. Содержание диссертационной работы и опубликованные по ней материалы: 7 статей в журналах, рекомендованном ВАК РФ и 9 тезисов российских и международных конференций, соответствуют специальности 03.01.02 – биофизика. Результаты диссертационного исследования изложены в опубликованных работах.

Диссертационная работа Подоплеловой Н.А. удовлетворяет требованиям, установленным п. 14 (об отсутствии заимствований без ссылок на источник и авторов) "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением 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).

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на V Всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии кровообращения (Москва, Россия, 31 января – 3 февраля 2012); VI Всероссийской конференции по клинической гемостазиологии и гемореологии в сердечно-сосудистой хирургии (Москва, Россия, 31.01.2013 – 02.02.2013); 38th FEBS Congress (Санкт-Петербург, Россия, 06.07.2013 – 11.07.2013); XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (Амстердам, Нидерланды, 29.06.2013 – 11.07.2013); 39th FEBS Congress (Париж, Франция, 30.08.2014 – 04.09.2014); 2nd EUPLAN Conference (Бешенберг, Франция, 24.09.2014 – 26.09.2014); XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (Торонто, Канада, 20.06.2015 – 25.06.2015); 62nd Annual Meeting of the Scientific and Standardization Committees of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (Монпелье, Франция, 25.05.2016 – 28.05.2016).

Основные публикации по теме работы

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., Panteleev 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.Panteleev // *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., Зефиоров Н.С. // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2011. – №4. – С. 665-670

Тезисы докладов

1. Podoplelova N. A. Coagulation factors X and Xa bind to phospholipid membranes in a hysteresis manner which allows them to be retained in thrombi under flow conditions. / Podoplelova N. A., Sveshnikova A. N., Ataullakhanov F. I., Panteleev M. A. // FEBS Journal: FEBS-EMBC Conference, 30 August – 4 September 2014, Paris, France. – Vol. 281, Suppl. 1. – P. 65.
2. Podoplelova N. A. Non-uniform distribution of coagulation factors on the membrane of activated platelets. / Podoplelova N. A., Sveshnikova A. N., Ataullakhanov F. I., Panteleev M. A. // J Thromb. Haemost: Abstracts of the XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 29 June – 4 July, 2013, Amsterdam, Netherlands. – Vol. 11, Supplement 2. – P. 903.
3. Podoplelova N. A. Binding of factor X to the activated platelet membrane demonstrates a multistep dissociation process that allows hysteresis effects. / Podoplelova N. A., Ataullakhanov F. I., Panteleev M. A. // J. Thromb. Haemost: Abstracts of the XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 29 June - 4 July, 2013, Amsterdam, Netherlands. – Vol. 11, Supplement 2. – P. 904.
4. Podoplelova N. A. The kinetics of binding of factor X to the activated platelet membrane. Podoplelova N. A., Ataullakhanov F. I., Panteleev M. A. // FEBS Journal: Abstracts of the 38th FEBS Congress, 6–11 July, 2013, Saint Petersburg. – Vol. 280, Supplement 1. – P. 106.
5. Подоплелова Н. А. Изучение связывания фактора X с мембраной активированных тромбоцитов. / Подоплелова Н. А., Пантелеев М. А. // Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии: сборник тезисов шестой всероссийской конференции, 31 января – 2 февраля 2013, Москва – М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН 2013. – С. 324-325.
6. Podoplelova N. A. Coagulation factors X and Xa bind to procoagulant platelets in a hysteresis manner enabling their retention in thrombi despite rapid flows. / Podoplelova N. A., Sveshnikova A. N., Ataullakhanov F. I., Panteleev M. A. // The 2nd EUPLAN Conference. 24-26 September 2014. – Le Bishenberg, France, Abstracts. – P. 107.
7. Podoplelova N. Blood coagulation factors bound to procoagulant platelets are concentrated in their cap structures to promote clotting. / Podoplelova N, Sveshnikova A, Kotova Y, Receveur N, Nechipurenko D, Obydennyi S, Kireev I, Gachet C, Ataullakhanov F, Mangin P, Panteleev M. // J Thromb. Haemost: 62nd Annual Meeting of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 25-28 May, 2016. Montpellier, France. – Vol.14(Supplement 1). – P. 108.
8. Подоплелова Н. А. Взаимодействие факторов свертывания с субпопуляциями активированных тромбоцитов. / Подоплелова Н. А., Свешникова А. Н., Котова Я. Н., Нечипуренко Д. Ю., Обыденный С. И., Атауллаханов Ф. И., Пантелеев М. А. // Сборник тезисов V съезда физиологов СНГ. 4–8 октября 2016. Сочи – Дагомыс. – Сочи, 2016. – С. 151
9. Podoplelova N. A. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to lipids protects from blood flow. / Podoplelova N.A., Sveshnikova A. N., Kurasawa J. H., Sarafanov A. G., Ataullakhanov, F. I., Panteleev, M. A. // J. Thromb. Haemost: Abstracts of the XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 20 – 25 June, 2015. Toronto, Canada. – Vol. 13(Supplement 2). – P. 51-52

Диссертация «Взаимодействие факторов свертывания крови с субпопуляциями активированных тромбоцитов» Подошловой Надежды Александровны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика. Заключение принято на заседании Ученого совета ЦТП ФХФ РАН.

На заседании присутствовали члены Ученого совета Центра в количестве 16 человек из 18, входящих в состав Ученого совета, а также научные сотрудники Центра. Заключение принято единогласно, протокол № 9 от 3 октября 2016 г.

Ученый секретарь
к.б.н.



Баландина Анна Николаевна