

ОТЗЫВ **официального оппонента**

на диссертационную работу Обыденного Сергея Ивановича «Динамика и механизмы образования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика

Актуальность темы

Диссертационная работа Обыденного Сергея Ивановича посвящена исследованию механизмов внутриклеточной сигнализации, ведущих к образованию субпопуляции прокоагулянтных тромбоцитов.

Актуальность и практическая значимость диссертационной работы не вызывает сомнения. Известно, что тромбоциты играют важную роль в гемостазе: формируют первичную «пробку», которая закрывает место повреждения сосудистой стенки, а также используют свою поверхность для активизации реакции свертывания. Нарушения их функционирования могут привести к кровотечениям или тромбозам. В этой связи изучение механизмов, ведущих к образованию прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов, крайне важно для понимания механизмов формирования сгустков и тромбов и возможности модуляции этих процессов через активацию тромбоцитов.

Научная новизна работы и достоверность полученных результатов

Роль кальция и митохондрий в регуляции перехода тромбоцитов в прокоагулянтное состояние обсуждается давно, однако причинно-следственная связь до недавнего времени оставалась неясной. Для решения этой задачи автором впервые разработана методика одновременного измерения концентрации цитоплазматического кальция, кальция в митохондриях, потенциала митохондриальной мембраны и выхода фосфатидилсерина в субпопуляциях тромбоцитов. Отслеживая динамику изменения концентрации кальция в цитоплазме и митохондриях индивидуальных тромбоцитах в ответ на различные активационные сигналы и сопоставляя данные сигналы с выявлением образования прокоагулянтной либо агрегантной субпопуляции тромбоцитов, автору впервые удалось определить закономерности перехода тромбоцитов в прокоагулянтное состояние и показать последовательность кальциевых событий в тромбоците, ведущих к экспонированию фосфатидилсерина. В диссертационной работе впервые исследована ультраструктура прокоагулянтных тромбоцитов и показано существование альфа-гранулярной шапки на мембране этих клеток, через которую прокоагулянтные тромбоциты взаимодействуют с другими клетками.

Использование в работе современных экспериментальных и статистических методов свидетельствует о достоверности полученных результатов и обоснованности положений, выносимых на защиту.

Практическая значимость

Разработанная автором методика одновременной регистрации динамики внутриклеточного кальция, потенциала митохондриальной мембраны, митохондриального кальция и выхода фосфатидилсерина в активированных тромбоцитах оказалась интересным способом получения новых данных о механизмах регуляции цитозольным и митохондриальным кальцием экспрессии фосфатидилсерина на плазматической мембране тромбоцитов. Данный подход может быть использован для разработки новых способов фармакологической регуляции перехода тромбоцитов в прокоагулянтное либо проагрегационное состояние для терапии различных заболеваний.

Идентификация клеточных и митохондриальных кальциевых транспортеров и выяснение механизмов их функционирования в различных субпопуляциях тромбоцитов открывает новые перспективы их использования в качестве мишеней терапевтического воздействия.

Обнаруженные автором морфологические особенности тромбоцитов, а именно распределение фибриногенной шапки на поверхности прокоагулянтных тромбоцитов, можно использовать для диагностики нарушений структуры клеток и подбора терапии при патологических процессах.

Общая характеристика работы

Представленная диссертация построена по традиционной схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов собственного экспериментального исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 93 ссылки. Работа иллюстрирована 5 таблицами и 41 рисунком.

Вводная часть даёт краткую характеристику изучаемой в диссертационной работе проблемы, её места в контексте современных исследований. Исходя из анализа функционального состояния и роли тромбоцитов в физиологических и патологических процессах аргументировано ставятся задачи исследования.

В обзоре литературы представлена общая характеристика тромбоцитов (морфология, механизмы активации, роль в регуляции гемостаза). Особое внимание в литературном обзоре уделено обсуждению роли кальция в регуляции активации тромбоцитов. Охарактеризованы субпопуляции тромбоцитов.

Обзор литературы хорошо написан, основан на анализе современной научной литературы. Специальное внимание уделяется характеристике субпопуляций тромбоцитов и подробно рассматриваются имеющиеся на сегодняшний день сведения о роли митохондрий и кальция в механизмах образования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов. Литературный обзор однозначно свидетельствует о высокой квалификации диссертанта и осведомлённости о современном уровне исследований по тематике выполненной работы. В конце литобзора обобщены все имеющиеся гипотезы

и поставлена задача. Обсуждаются существующие гипотезы механизмов распределения тромбоцитов по субпопуляциям.

Раздел «Материалы и методы исследований» содержит описание оборудования, буферных сред, реактивов, программного обеспечения и методик, использованных в ходе исследований. Описаны этапы работ по получению суспензии тромбоцитов, их прокраски флуоресцентными зондами для исследований с применением конфокальной микроскопии. Подробно описаны стадии фиксации и подготовки тромбоцитов для изучения их ультраструктуры с применением электронной микроскопии. Из данного раздела следует, что работа выполнена на высоком методическом уровне с применением современного оборудования и использованием статистической обработки полученных данных. Все это обеспечивает достоверность результатов работы и сделанных на их основе выводов.

В третьей главе представлены результаты работы и их обсуждение.

С помощью современного оборудования по флуоресцентной микроскопии и разработанного оригинального методического подхода Сергею Ивановичу удалось впервые показать, что для перехода тромбоцитов в прокоагулянтное состояние не обязательно наличие постоянно высокой концентрации кальция в цитоплазме, а важным является наличие продолжительных колебаний концентрации цитозольного кальция. Большой интерес представляют полученные автором данные о том, что амплитуда и частота колебаний концентрации цитоплазматического кальция являются определяющими для наполнения митохондриального матрикса ионами кальция, что, в свою очередь, приводит к перегрузке митохондрий кальцием и открытию митохондриальных пор – ключевому событию, приводящему к образованию прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов.

Полученные результаты и их интерпретация изложены корректно.

В разделе «Заключение» автор обобщил полученные результаты, и сформулировал выводы, которые отражают достижение поставленной цели исследования. Рассмотрение всех этих вопросов проведено корректно, чётко связано с представленными ранее экспериментальными данными. **Выводы, представленные в работе, логичным образом вытекают из представленных результатов и научно обоснованы.**

Следует подчеркнуть, что все главы диссертации написаны четко, логично и хорошим языком. Удачным является добавление в работу приложений, дающих дополнительную наглядную информацию о роли тромбоцитов в гемостазе и механизмах активации этих клеток. Описание результатов исследования сопровождают хорошие фотографии и аккуратно выполненные рисунки, что позволяет по заслугам оценить качество работы.

Замечания к работе

Имеющиеся к работе замечания носят в основном дискуссионный характер, связаны с неточностями или опечатками при написании диссертации и не влияют на высокую оценку результатов этой работы.

– В цитированиях литературы представлено около 20 работ за последние 5 лет, из которых 13 статей – работы авторов группы руководителя

диссертанта. Хотелось бы больше видеть информации об исследованиях в том числе и других научных групп.

– В какой концентрации использовали циклоспорин А для ингибирования митохондриальной поры? Насколько специфично данное вещество для ингибирования митохондриального циклофилина D?

– Не везде указан размер масштабного отрезка на рисунках (например, рис. 1.6).

– В работе встречается ряд опечаток (например, стр. 25 «сравнительные субпопуляций», стр. 64 «построено распределения», стр. 68 «усредненной значение»).

– Не везде указаны ссылки на литературу (стр. 57, «согласно работам других авторов...»).

Заключение

Считаю, что диссертация Обыденного Сергея Ивановича «Динамика и механизмы образования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов» является законченным научно-квалификационным трудом и соответствует специальности 03.01.02 – биофизика. Она полностью отвечает требованиям ВАК и пунктам 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 01.10.2018 №1168. Сам диссертант заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Официальный оппонент
кандидат биологических наук



Горудко Ирина Владимировна

06.01.2020



Горудко Ирина Владимировна

Ученая степень: к.б.н.

Ученое звание: доцент

Адрес: г. Минск, пр. Независимости, 4, 220030

Телефон: +375295251811

E-mail: irinagorudko@gmail.com

Наименование организации: Белорусский государственный университет

Должность: доцент

ведущий научный сотрудник лаборатории

биофизики и биотехнологии физического факультета

Белорусского государственного университета,

кандидат биологических наук