

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Обыденного Сергея Ивановича на тему «Динамика и механизмы образования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности 03.01.02 – «Биофизика»

Актуальность темы. Диссертационная работа Обыденного Сергея Ивановича посвящена системе тромбообразования в системе свертывания крови и, в частности, регуляции агрегатного состояния основных участников этого процесса – тромбоцитов. Известно, что нарушения в её работе приводят как к кровотечениям, так и тромбозам.

В работе показано, что тромбоциты не являются однородной популяцией и различаются по морфологии, уровню внутриклеточного Ca^{2+} , количеству митохондрий (МХ), состоянию цитоскелета, составу белков на поверхности клетки. Процесс коагуляции тромбоцитов также не является прямым переходом из состояния покоя в прокоагулянтное состояние. При переходе в прокоагулянтное состояние тромбоциты могут находиться длительное время в промежуточном активном, но не-прокоагулянтном состоянии, когда в них наблюдаются колебания кальция. В этом состоянии тромбоциты не обладают свойством ускорять свертывание крови и не имеют на своей поверхности альфа-гранулярных белков и их цитоскелет не деградирован полностью. Показано, что количество тромбоцитов в этом промежуточном состоянии коррелирует с некоторыми патологиями и этот параметр может быть использован для их диагностики и лечения. Понимание механизмов образования этой субпопуляции тромбоцитов, ее стабилизации и обращения в состояние покоя может быть основой управления системой свертывания крови в организме. Роль МХ, удержание ими ионов Ca^{2+} , формирование митохондриальной поры могут быть ключевыми моментами в индукции перехода в прокоагулянтное состояние и не изучены в настоящее время.

Цель и задачи исследования состояли в выявлении механизмов формирования прокоагулянтной субпопуляции активированных тромбоцитов и анализе распределения альфа-гранулярных белков по поверхности клетки. Решение этих задач потребовало разработать методику для одновременного измерения таких параметров как концентрация цитоплазматического кальция, кальция в митохондриях, потенциала митохондриальной мембраны и выхода фосфатидилсерина на поверхность в субпопуляциях тромбоцитов. Для активации тромбоцитов использовали тромбин и пептид, стимулирующий тромбиновый рецептор PAR1. Применение данной методики позволило выявить такие изменения этих параметров в индивидуальных тромбоцитах, которые предрасполагали к переходу в прокоагулянтное состояние, в том числе охарактеризовать распределение альфа-гранулярных белков на поверхности прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов.

Научная новизна работы. В работе впервые были получены распределения тромбоцитов по концентрации цитоплазматического кальция, потенциалу митохондриальной мембраны и выходу фосфатидилсерина на внешнюю сторону мембраны и показана корреляция данных параметров с различными состояниями тромбоцитов при переходе в прокоагулянтное состояние.

Показано, что уровень цитоплазматического кальция в тромбоците до активации является показателем скорости дальнейшего перехода тромбоцитов в прокоагулянтное состояние. Показано, что при этом переходе альфа-гранулярные белки собираются в небольшой выпуклой структуре, названной "шапкой", эта структура отвечает за адгезионные свойства клеток. Необходимыми стадиями перехода тромбоцитов в прокоагулянтное состояние являются: накопление кальция в митохондриях, последующий выброс кальция из митохондрий, повышение уровня кальция в цитоплазме, и экспонирование фосфатидилсерина. Тромбоциты с меньшим числом митохондрий и большей концентрацией цитоплазматического кальция в покое имеют большую вероятность стать прокоагулянтными в ответ на активацию.

Практическая значимость. Переход в прокоагулянтное состояние является контролируемым процессом. Нарушение этого процесса в ряде

заболеваний приводит к исчезновению прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов. Поэтому количество тромбоцитов, находящихся в этом состоянии, может быть диагностическим параметром. А понимание процессов, ведущих к образованию прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов, открывает новые пути фармакологической коррекции. На основании вышеизложенного, можно считать, что тема диссертационной работы С.И. Обыденного актуальна, а сама работа важна как в фундаментальном, так и в прикладном отношении.

Общая характеристика и содержание работы. Диссертационная работа С.И. Обыденного написана по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, описание используемых материалов и методов, изложение результатов и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы (93 источников). Материал изложен на 105 страницах, включает 41 рисунок и 3 приложения.

Первая глава работы С.И. Обыденного представляет собой подробный обзор данных литературы и посвящена описанию тромбоцитов и их функций в свертывании крови. Достаточно полно описаны пути передачи сигнала при активации тромбоцитов и существующие гипотезы о механизмах формирования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов. В целом, обзор производит хорошее впечатление, подготавливает читателя к пониманию стоящих перед исследователем задач. Обзор литературы формирует цель и задачи исследования.

Вторая глава диссертации посвящена описанию **методов исследования**. Работа выполнена с применением широкого набора современных биохимических и биофизических методов, таких как: конфокальная микроскопия, иммуногистохимия, электронная микроскопия. Этот раздел очень хорошо оформлен и содержит детальную информацию обо всех экспериментальных подходах, использованных в работе. Тромбоциты крови человека активировались тромбином, и в течение 15 минут наблюдался переход с образованием альфа-гранулярной шапки, с участием которой клетки прокоагулянтной субпопуляции образовывали контакты с другими клетками. Прокоагулянтные тромбоциты отличались морфологически и представляли собой шарообразные клетки с редко встречающимися

органеллами и содержимым более низкой плотности, относительно непрокоагулянтных тромбоцитов.

В третьей главе диссертационной работы представлены результаты исследования и их обсуждение. В данном разделе работы показано, что клетки гетерогенны и по-разному отвечают на активацию. Активация тромбоцитов запускает в тромбоцитах кальциевые осцилляции, которые либо сопровождались повышением базального уровня цитоплазматического кальция и выходом фосфатидилсерина; при этом клетка переходила в прокоагулянтное состояние. Либо колебания кальция не сопровождались значительным повышением базального Ca^{2+} и клетки оставались в непрокоагулянтном состоянии. Таким образом, все клетки в экспериментах были разделены на две субпопуляции: клетки, связавшие Аннексин V (ФС+), и клетки без Аннексина V (ФС-). Показано, что порог перехода в прокоагулянтное состояние индивидуален для каждой клетки. Интенсивность ответа тромбоцитов зависела как от вида активатора и его концентрации, так и от «исходного состояния» тромбоцита. Основным отличием, влияющим на скорость перехода в прокоагулянтное состояние является количество митохондрий и их кальциевая емкость. Активация тромбоцитов приводила к увеличению митохондриального кальция и последующего его выброса через пору РТР, падению мембранного потенциала и выходу ФС на поверхность мембраны у всех прокоагулянтных тромбоцитов. Полученные данные подтверждают гипотезу, что именно митохондрии являются регулятором переходного процесса при активации тромбоцитов, и от их количества и степени их перегрузки кальцием зависит попадание тромбоцита в ту или иную субпопуляцию. В работе получены даже некоторые количественные оценки. Клетки с меньшим числом митохондрий и более высоким внутриклеточным кальцием требовали меньшего воздействия и чаще становятся прокоагулянтными. Тромбоциты с числом митохондрий ниже 5 становились прокоагулянтными в ~30% случаях, а тромбоциты с 5 и более митохондриями в 10-15% случаях.

Представление результатов заканчивается их общим обсуждением и выводами, которые подводят итог проведенного исследования и демонстрируют научную новизну результатов, оригинальность и логику

работы. Выводы, представленные в работе, логичным образом вытекают из представленных результатов и научно обоснованы.

По материалам диссертации опубликовано 29 публикаций: 19 тезисов конференций и 10 статей в российских и зарубежных рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Замечания по работе. При анализе работы появились некоторые замечания и вопросы.

Принято использовать термин **гибель** клетки, а не **смерть**.

В некоторых случаях говорится, что «кальциевые осцилляции, способствуют накоплению кальция в митохондриях» (Это неточно, т.к. колебания могут быть обратимыми, и эффект накопления зависит от уровня базального кальция в цитоплазме).

Приведенные выше замечания и вопросы в основном имеют уточняющий и дискуссионный характер. Таким образом, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования.

Заключение. В заключении можно сказать, что диссертационная работа С.И. Обыденного написана ясно и грамотно, хорошо иллюстрирована и аккуратно оформлена. Представленные в работе результаты получены с использованием репрезентативных выборок и подвергнуты соответствующей статистической обработке, что позволяет считать их значимыми и подтверждающими гипотезы автора.

Полученные в диссертационной работе новые результаты экспериментальных исследований позволили сформулировать хорошо обоснованные научные положения о механизмах образования и контроля прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов, что, несомненно, является значительным шагом в понимании процесса тромбообразования в системе свертывания крови.

Диссертация С.И. Обыденного является законченным научно-квалификационным трудом и соответствует специальности 03.01.02 – «Биофизика». Диссертация полностью отвечает требованиям ВАК, и пунктам 9-14 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г № 842 в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 01.10.2018г № 1168. Сам диссертант заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор,

заведующий лабораторией внутриклеточной сигнализации Института биофизики клетки Российской академии наук Федерального исследовательского центра «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Зинченко Валерий Петрович

17.01.2020 г.

Адрес: 142290, г. Пущино Московской области,

ул. Институтская, 3, ИБК РАН

Тел. (4967) 73-05-19; (4967) 33-05-09

E-mail: vpz@mail.ru

Подпись В.П. Зинченко заверяю



дир. науч. цн
С.А. Тюпарев