



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии
Российской академии наук
(ЦТП ФХФ РАН)

«23» июня 2022 г., 109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30, тел. 8 (495) 678-31-16

исх № 6/1-22(УС)

УТВЕРЖДАЮ
Директор ЦТП ФХФ РАН,
 М.А. Пантелеев
«23» июня 2022 г.
М.П.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии
наук

Диссертация «Исследование механизмов регуляции активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI» выполнена в лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН).

В период подготовки диссертации Мартьянов Алексей Александрович работал в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН; по совместительству).

В 2019 г. окончил Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова по специальности «биофизика», с 03.10.2019 по настоящее время проходит обучение в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН) по специальности биофизика (справка №12113-364/50).

Справка № 151 о сдаче кандидатских экзаменов выдана 20.05.2022 г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Научный руководитель: Свешникова Анастасия Никитична, доктор физико-математических наук, заведующая лабораторией внутриклеточной сигнализации и системной биологии ЦТП ФХФ РАН и, по совместительству, старший научный сотрудник лаборатории физико-химии композиций синтетических и природных полимеров Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии наук.

Тема диссертационной работы и научный руководитель утверждены решением Ученого совета ИБХФ РАН №71 от 16.06.2022 г., приказ №5-УС от 22.06.2022.

По результатам рассмотрения диссертации «Исследование механизмов регуляции активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI» принято следующее заключение:

Оценка выполненной работы

Диссертация Мартьянова А.А. является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании полученных автором результатов исследований разработаны положения, имеющие актуальное научное и практическое значение для биофизики и медицины. Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Актуальность темы

Тромбоциты – мелкие (2-4 мкм) безъядерные клетки крови, производящиеся из мегакариоцитов костного мозга и циркулирующие в кровотоке в течение 7-10 дней до момента утилизации в селезенке или печени. Основная задача тромбоцитов – предотвращение кровопотери при нарушении целостности кровеносной системы. Помимо гемостаза тромбоциты также играют значимую роль для нормального эмбрионального развития организма и формирования новых сосудов (ангиогенеза). Активация тромбоцитов происходит через GPCR-рецепторы или через рецепторы, запускающие тирозинкиназную сигнализацию. К последним относят рецепторы тромбоцитов GPVI и CLEC-2, активируемые коллагеном и подоплатином, соответственно. Коллаген – ключевой компонент стенки кровеносных сосудов, запускающий активацию тромбоцитов при повреждении сосудов. Рецептор CLEC-2 является принципиально важным для предотвращения смещения крови и лимфы. Рецептор тромбоцитов CLEC-2 имеет и патологическую значимость. Показано, что клетки капошиформной гемангиоэндотелиомы (КГЭ) – редкой сосудистой опухоли – экспрессируют подоплатин, который может связываться с рецептором CLEC-2 тромбоцитов и инициировать их активацию. CLEC-2 также обладает значимой ролью для развития тромбозов глубоких вен. Совместно CLEC-2 и GPVI принципиально важны для поддержания структуры тромбов, а также для предотвращения кровотечений при экстравазации иммунных клеток из кровотока при наличии воспалительных процессов в тканях.

Связывание рецепторов GPVI с коллагеном или рецепторов CLEC-2 с подоплатином инициирует кластеризацию этих рецепторов на поверхности тромбоцитов. Роль динамики и паттерна кластеризации рецепторов на поверхности тромбоцитов для дальнейшей сигнализации в тромбоцитах не ясна. При кластеризации рецепторов GPVI происходит фосфорилирование их цитоплазматических доменов тирозинкиназами семейства Src (SFK). Кластеризованные и активированные рецепторы CLEC-2 фосфорилируются тирозинкиназами Syk. С фосфорилированными рецепторами связываются покоящиеся Syk киназы, которые запускают фосфоинозитидную и кальциевую сигнализацию, которые определяют все функциональные ответы тромбоцитов на активацию: изменение формы; активацию мембранных интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$; секрецию тромбоцитарных α - и плотных гранул; прокоагулянтный ответ (основа для активации плазменного каскада свёртывания крови). Определение ключевых механизмов инициации тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах является ключом для тонкой регуляции активации тромбоцитов через данный путь.

Несмотря на большой объём ранее опубликованных данных о последовательности событий при активации тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах, а также о физиологической значимости рецепторов CLEC-2 и GPVI, кинетические и динамические характеристики данных путей мало изучены. Определение конкретных стадий активации тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах, лимитирующих скорость, позволит идентифицировать новые мишени для терапевтического воздействия при тромбозах, возникающих в результате дисфункции данных сигнальных путей.

Личное участие автора в получении результатов

Автор проводил анализ научной литературы, разработку математических моделей CLEC-2- и GPVI-индуцированной сигнализации в тромбоцитах, планировал и проводил эксперименты по проточной цитометрии, проводил эксперименты по вестерн-блоттингу, проводил дизайн и пробоподготовку экспериментов по флуоресцентной микроскопии, а также занимался подготовкой иллюстраций, написанием научных статей и тезисов по материалам работы. Материалы диссертации доложены автором в устных докладах на международных конференциях.

Степень обоснованности и достоверности полученных результатов

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивались использованием общепринятых современных методов, таких как проточная цитометрия, флуоресцентная микроскопия, вестерн блоттинга, статистическая обработка результатов, а также использованием распространенных методов математического моделирования и статистической обработки данных, реализованных в общедоступных программных пакетах. Достоверность полученных результатов также подтверждается их согласованностью с известными литературными источниками.

Научная новизна

1. Был создан метод анализа внутриклеточной кальциевой сигнализации в тромбоцитах методом проточной цитометрии. Данным методом впервые было показано, что рецептор CLEC-2 индуцирует кальциевый ответ в тромбоцитах. Показано, что температура и насыщение мембраны холестерином значительно влияют на скорость активации тромбоцитов через рецептор CLEC-2.
2. Впервые получено, что кальциевые ответы тромбоцитов здоровых доноров на активацию рецептора GPVI значительно различаются, что может вызвано разными количествами рецепторов GPVI на поверхности тромбоцитов у здоровых доноров.
3. Показано, что у пациентов с КГЭ значительно нарушена активация тромбоцитов через рецептор CLEC-2, что может быть вызвано уменьшением количества рецепторов CLEC-2 на поверхности тромбоцитов.
4. Составлена полная схема внутриклеточной тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах при их активации через рецепторы CLEC-2 и GPVI. На основании данной схемы разработана первая математическая модель внутриклеточной тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах. С помощью модели было показано, что кластеризация рецепторов является одной из скорость-лимитирующих реакций для активации тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах.

Практическая значимость работы

Разработанная экспериментальная методика может быть использована для исследования внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах здоровых доноров и пациентов, что позволит идентифицировать механизмы развития нарушений функции тромбоцитов. Разработанная модель может быть использована для исследования механизмов развития гематологических заболеваний и исследования эффектов различных вариантов терапии на функцию тромбоцитов пациентов.

Ценность научных работ соискателя, соответствие содержания диссертации специальности, полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Работа соответствует специальности 1.5.2. Биофизика на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Материалы и основные результаты диссертации достаточно полно изложены в опубликованных работах Мартьянова Е.А., из них 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и тезисы 10 докладов на российских и международных конференциях.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на I, III European Congress on Thrombosis and Hemostasis; XXVI, XXVII Congress of the International Society on Thrombosis and Hemostasis; XXVI международная конференция «Математика. Компьютер. Образование»; 45th Federation of the European Biochemical Societies (FEBS) Congress.

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

1. **Martyanov, A.A.** Control of Platelet CLEC-2-Mediated Activation by Receptor Clustering and Tyrosine Kinase Signaling / A.A. Martyanov, F.A. Balabin, J.L. Dunster, M.A. Panteleev, J.M. Gibbins, A.N. Svshnikova // *Biophysical Journal*. – 2020. – Vol. 118 – № 11 – P. 2641–2655. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.04.023> (Scopus: 3.54; WOS: 3.854).
2. Garzon Dasgupta, A.K. Development of a Simple Kinetic Mathematical Model of Aggregation of Particles or Clustering of Receptors / A.K. Garzon Dasgupta, **A.A. Martyanov**, A.A. Filkova, M.A. Panteleev, A.N. Svshnikova // *Life*. – Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. – Vol. 10 – № 6 – P. 97. DOI: <https://doi.org/10.3390/life10060097> (Scopus: 1.9; WOS: 3.817)
3. **Martyanov, A.A.** Heterogeneity of Integrin α IIb β 3 Function in Pediatric Immune Thrombocytopenia Revealed by Continuous Flow Cytometry Analysis / A.A. Martyanov, D.S. Morozova, M.A. Sorokina, A.A. Filkova, D.V. Fedorova, S.S. Uzueva, E.V. Suntsova, G.A. Novichkova, P.A. Zharkov, M.A. Panteleev, A.N. Svshnikova // *International Journal of Molecular Sciences*. – Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. – Vol. 21 – № 9 – P. 3035. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21093035> (Scopus: 5.838; WOS: 4.556)
4. Степанян, М.Г. Активация тромбоцитов через рецептор GPVI: вариабельность ответа / М.Г. Степанян, А.А. Филькова, Гарсон Дасгупта А.к., **А.А. Мартьянов**, А.Н. Свешникова // *Биологические Мембраны*. – 2020. – Т. 37 – № 6. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0233475520060079> (РИНЦ: 0.949)
5. **Мартьянов, А.А.** CLEC-2-индуцированная внутриклеточная сигнализация в тромбоцитах крови / А.А. Мартьянов, В.Н. Канева, М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова // *Биомедицинская химия*. – НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 2018. – Т. 64 – № 5 – С. 387–396. DOI: <https://doi.org/10.18097/PBMC20186405387>. (РИНЦ: 0.27)

6. **Мартьянов, А.А.** Компьютерное моделирование внутриклеточной сигнализации при активации тромбоцитов крови фукоиданом / А.А. Мартьянов, Ф.А. Балабин, А.С. Майоров, Е.В. Шамова, М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова // Биологические Мембраны. – 2018. – Т. 35 – № 5. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0233475518040102> (РИНЦ: 0.949)
7. **Мартьянов, А.А.** Физиологические и патофизиологические аспекты активации тромбоцитов крови через рецептор CLEC-2 / А.А. Мартьянов, В.Н. Канева, М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова // Онкогематология. – 2018. – Т. 13 – № 3 – С. 83–90. DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2018-13-3-83-90> (РИНЦ: 0.585)

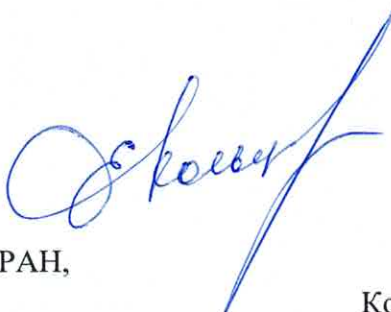
Публикации в трудах конференций и съездов:

1. Международная конференция «International Society on Thrombosis and Hemostasis 2020 Congress». Секция «Platelet Disorders and von Willebrand Disease: Acquired Thrombocytopenias». Милан, Италия, 12-14 июля 2020. Доклад: «A Subpopulation of ITP Patients Resembling Glanzmann Thrombasthenia Phenotype Revealed by Flow Cytometry Analysis of Platelet Intracellular Signalling».
2. Международная конференция «European Congress on Thrombosis and Hemostasis (ECTH) 2019». Секция «Platelets». Глазго, Великобритания, 2-4 октября 2019. Доклад: «Mathematical model of platelet response to collagen-related peptide activation suggests a role for PNX-1 in GPVI induced platelet activation».
3. Международная конференция «European Congress on Thrombosis and Hemostasis (ECTH) 2019». Секция «Platelets». Глазго, Великобритания, 2-4 октября 2019. Доклад: «Novel continuous flow cytometry approach to ITP diagnosis is capable of identifying subtypes of the disease and moving forward its understanding».
4. Международная конференция «XXVI международная конференция «Математика. Компьютер. Образование». Пушино, Россия, 28 января – 2 февраля 2019. Доклад: «Влияние температуры на активацию тромбоцитов через ассоциированные с тирозинкиназами или G-белками рецепторы».
5. Международная конференция «The Scientific and Standardization Committee (SSC) International Society on Thrombosis and Hemostasis 2018 Congress». Дублин, Ирландия, 17-21 июля 2018. Доклад: «Platelet CLEC-2 Ligation Offers Critical Enhancement for ADP and Thrombin-induced Activation via Synergy between Intracellular Signalling Pathways of CLEC-2 and G-protein Coupled Receptors».
6. Международная конференция «XXVI международная конференция «Математика. Компьютер. Образование». Пушино, Россия, 28 января – 2 февраля 2019. Доклад: «Гомогенная математическая модель образования кластеров рецепторов произвольного размера».
7. Международная конференция «XXIII съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова». Воронеж, Россия, 18-23 сентября 2018. Доклад: «Роль текучести мембран тромбоцитов крови человека при активации их через рецептор CLEC-2».
8. Международная конференция «International Society on Thrombosis and Hemostasis 2020 Congress». Берлин, Германия, 8-13 июля 2017. Доклад: «Activation of Human Blood Platelets through CLEC2 is Slackened due to the Diffusion of Receptors into the Signalosome Region, but Still Can Induce Cytosolic Calcium Spiking in Single Platelets».
9. Международная конференция «European Congress on Thrombosis and Hemostasis (ECTH) 2016». Секция «Platelets». Гаага, Нидерланды, 28-30 сентября 2016. Доклад: «Computational systems biology analysis of platelet CLEC2 signaling».
10. Международная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем; Тринадцатый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков». Минск, Беларусь, 27–29 июня 2018 г. Доклад: «Синергия между CLEC-2 и АДФ/тромбин-индуцированной активацией тромбоцитов».

Диссертационная работа Мартьянова Алексея Александровича «Исследование механизмов регуляции активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI» удовлетворяет требованиям, установленным пп. 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в ред. Постановления Правительства РФ от 11.09.2021 №1539) и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Заключение принято на заседании Ученого совета ЦТП ФХФ РАН. На заседании присутствовали члены Ученого совета Центра в количестве 13 человек из 16, входящих в состав Ученого совета, а также научные сотрудники Центра. Заключение принято единогласно, протокол № 6 от 23 июня 2022 г.

Ученый секретарь
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Центра теоретических проблем
физико-химической фармакологии РАН,
к.б.н.



Кольцова Е.М.