

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы

Мартьянова Алексея Александровича

«Исследование механизмов регуляции активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика

В диссертация Мартьянова А.А. посвящена исследованию активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI. Рецептор GPVI необходим для активации тромбоцитов при их контакте с коллагеном при повреждении стенок кровеносного сосуда. Рецептор CLEC-2 позволяет тромбоцитам предотвращать смешение крови и лимфы при повреждении каждой из систем. Исследования фундаментальных механизмов регуляции внутриклеточной сигнализации и функциональных ответов тромбоцитов позволяют разрабатывать новые подходы как для диагностики заболеваний, так и для их медикаментозной терапии. Значимая часть современных лекарств действует именно на мембранные рецепторы.

Актуальность темы исследований. Одной из характерных особенностей активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI является её «замедленность» по сравнению с активацией тромбоцитов через G-белковые рецепторы. При этом CLEC-2 индуцированная активация тромбоцитов происходит ещё медленнее нежели GPVI-индуцированная. Динамические характеристики данных сигнальных путей мало изучены и актуальность диссертационной работы Мартьянова А.А. не вызывает сомнения.

Научная новизна. Автором разработана теоретическая модель активации тромбоцитов через рецептор CLEC-2, учитывающая также и кластеризацию рецепторов после их связывания с лигандом. С помощью модели предсказано, что кластеризация рецепторов является скоростью-лимитирующей стадией в активации тромбоцитов через данный сигнальный путь. Для подтверждения предсказаний модели автором был разработан метод динамической оценки концентрации свободных ионов кальция в цитозоле тромбоцитов с помощью проточной цитометрии. С помощью данного метода показано, что активация тромбоцитов через CLEC-2 может быть замедлена при удалении холестерина из мембраны тромбоцитов и/или при снижении температуры окружающей среды.

Автором также показано, что при активации тромбоцитов через рецепторы GPVI наблюдается значительная вариабельность кальциевых ответов. Согласно предсказанию модели, подобная вариабельность может быть обусловлена количеством рецепторов GPVI на поверхности тромбоцитов.

Автор провёл оригинальное исследование кальциевой сигнализации в тромбоцитах пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой и показал, что при данном заболевании происходит ослабление кальциевых ответов тромбоцитов на активацию их через рецептор CLEC-2. С помощью модели было предсказано, что это может происходить из-за уменьшения количества рецепторов CLEC-2 на поверхности тромбоцитов. Исходя из этих результатов предложен механизм, согласно которому опухоль у пациентов «фильтрует» тромбоциты, оставляя в кровотоке только тромбоциты с низкой экспрессией рецептора CLEC-2, в то время как тромбоциты с нормальной экспрессией связываются с клетками опухоли и остаются в ней.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнения. Автор применял как теоретические так и экспериментальные подходы. В рамках экспериментальной работы диссертант использовал такие методы как проточная цитометрия, вестерн-блоттинг и произвёл статистическую обработку результатов.

Результаты исследования опубликованы в 17 научных работах, из которых 7 статей в журналах, входящих в перечень журналов, рекомендованных ВАК, а также базы данных Scopus

и Web of Science, и 10 тезисов докладов на российских и международных научных конференциях. Алексей Александрович является первым автором в 5 работах, что подтверждает его ключевое участие в этом исследовании.

Теоретическая и практическая значимость исследования заключается в применимости разработанного теоретико-экспериментального метода для исследования механизмов регуляции внутриклеточной сигнализации как в тромбоцитах, так и в других клетках. Полученные автором результаты вновь подчёркивают значимость кластеризации мембранных белков для нормального функционирования клеток. Разработанные методы также могут быть применены для исследования механизмов развития гематологических заболеваний, что было продемонстрировано автором на примере капошиформной гемангиоэндотелимы (КГЭ).

Автореферат позволяет составить полноценное впечатление о проведённом исследовании, которое, без сомнения, выполнено на высоком методическом уровне. По ходу ознакомления с авторефератом у меня возникли следующие вопросы и пожелания:

1. В тексте автореферата утверждается, что модели «хорошо описывали кластеризацию». Хотелось бы знать параметры сравнения теоретических и экспериментальных данных.

2. Я предполагаю, что на рисунке 6В представлены данные нормированной интенсивности соответствующих полос Вестерн-блотов, но в подписи шкалы утверждается, что это ненормированная интенсивность в абсолютных единицах.

3. Хотелось бы на рисунке 7 видеть пример флуоресцентной микрофотографии одиночных тромбоцитов при окраске антителами к P-LAT, который, видимо, был в предыдущих редакциях автореферата, так как есть упоминания в тексте.

4. В этой же части работы удивляет использование mQ как контроля, поскольку добавление значительного количества воды приводит к изменению осмолярности раствора. Все остальные растворы, добавляемые к клеткам в этой серии экспериментов, готовились на mQ? Возможно, количество добавляемой воды было незначительное, но я рекомендую автору в будущем использовать в качестве контроля буфер или растворить.

5. На мой взгляд, в выводе 1 предложение «Нарушение паттерна и скорости кластеризации рецепторов может замедлять активацию тромбоцитов более чем на 200 секунд» требует уточнения или переформулирования, так как не позволяет ясно представить что именно приводит к замедлению.

6. Также интересно, есть ли у автора предположения, каким образом с терапевтической точки зрения можно было бы использовать тот факт, что количество рецепторов CLEC-2 на тромбоцитах пациентов с КГЭ снижено?

Сделанные мной замечания на умахают значимости настоящего исследования. Считаю, что диссертационная работа Мартьянова А.А. является законченным научно-квалификационным трудом и соответствует требованиям ВАК и пунктам 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, с изменениями Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 01 октября 2018 г. № 1168, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Балацкая Мария Николаевна, к.б.н. (биофизика),
Старший научный сотрудник ФФМ МГУ,
Россия, 119192, Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, к.1

