

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

Диссертация Мартьянова А.А. посвящена исследованию механизмов регуляции тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах. Тирозинкиназная сигнализация в тромбоцитах запускается рецепторами к коллагену GPVI, а также рецепторами к подопланину CLEC-2. При этом происходит активация тирозинкиназ Syk и SFK, инициирующих формирование LAT-сигнасомы, к которой присоединяются фосфоинозитид-3-киназа и фосфолипаза $C\gamma 2$ и запускают фосфоинозитидную и кальциевую сигнализацию, соответственно. Данные пути сигнализации совместно с цАМФ/цГМФ сигнализацией регулируют ключевые функциональные ответы тромбоцитов: изменение формы, секрецию гранул, активацию тромбоцитарных интегринов и прокоагулянтный ответ.

Основная часть диссертационной работы Мартьянова А.А. посвящена построению компьютерной модели CLEC-2 сигнализации в тромбоците. Как и большинство других рецепторов на тромбоцитах, CLEC-2 кластеризуется при связывании с лигандом. Описание кластеризации рецепторов представляет собой достаточно трудоёмкую задачу с вычислительной точки зрения. Однако автором был использован элегантный подход, сводящий описание кластеризации к двум уравнениям: уравнению, описывающему динамику концентрации мономеров рецепторов, и уравнению, описывающему динамику концентрации кластеров рецепторов. Это позволило описать доступные из литературы экспериментальные данные по кластеризации не только рецептора CLEC-2, но и рецептора GPVI и показать, что существует два различных режима кластеризации. При первом режиме наблюдалось быстрое образование димеров рецепторов, которые затем формировали более крупные кластеры. При другом режиме кластеризации кластеры формировались постепенно, без быстрого образования димеров. Сопоставление результатов моделирования с экспериментальными данными позволило сделать вывод, что в реальности наблюдается первый режим кластеризации. На основании полученных результатов можно также сделать вывод, что кластеризация рецепторов CLEC-2 происходит вследствие, в том числе, связывания рецепторов с мультимерными лигандами, такими как родоцитин или фукоидан, а не только в результате внутриклеточных перестроений.

Одним из наиболее важных выводов работы стало то, что кластеризация рецепторов является одной из скорость-лимитирующих стадий для дальнейшей активации тромбоцитов. Данное предсказание было подтверждено экспериментально с помощью проточной цитометрии и вестерн-блоттинга. Однако важно подчеркнуть, что выбранные методы оценки влияния кластеризации на активацию тромбоцитов являются косвенными. Автор утверждает, что зависимость CLEC-2 индуцированной сигнализации от насыщенности мембраны тромбоцитов холестерином и/или температуры окружающей среды является подтверждением значимости кластеризации рецепторов для данного сигнального пути. Однако концентрация холестерина влияет не только на скорость кластеризации рецепторов. Аналогично, температура также влияет на множество

элементов сигнального пути, а не только на кластеризацию рецепторов. Тем не менее, в совокупности, данные подходы, действительно, могут быть использованы для оценки значимости кластеризации для сигнализации в тромбоцитах.

Важным достоинством работы является демонстрация применимости разработанных компьютерных моделей внутриклеточной сигнализации тромбоцитов от рецепторов CLEC-2 и GPVI для исследования тромбоцитов здоровых доноров, а также пациентов с онкогематологическими заболеваниями. С использованием моделей автор, с одной стороны, предсказал, что вариабельность ответов тромбоцитов здоровых доноров через рецептор GPVI может быть объяснена вариабельностью количества рецепторов на самих тромбоцитах. Это хорошо согласуется с литературными данными о том, что количество GPVI на тромбоцитах у людей может различаться более чем в 2 раза. С помощью модели рецептора CLEC-2 автор показал, что на тромбоцитах пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой может быть снижено количество рецепторов. Подобное применение моделей для исследования наблюдаемых экспериментально феноменов является хорошим примером применимости теоретических подходов в современных биологических исследованиях.

Тем не менее, важно подчеркнуть, что при использовании данных пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой автором было включено в исследование всего 5 педиатрических здоровых доноров. С другой стороны, так как средний возраст пациентов в исследовании был менее двух лет, поиск здоровых контролей был явно нетривиальной задачей.

В качестве основного экспериментального метода автором была использована проточная цитометрия, с помощью которой была проведена оценка концентрации свободных ионов кальция в цитозоле тромбоцитов. Для этого тромбоциты загружались кальций-чувствительными флуорофорами, а затем флуоресценция была пересчитана в концентрацию ионов кальция с помощью известной формулы Гринкевича. Обычно для оценки концентрации кальция в клетках используют спектрофлуориметрию, однако разработанный автором метод на основе проточной цитометрии, потенциально, является более точным и эффективным.

Результаты и выводы работы представляют собой значительную научную ценность и значительно расширяют современные понимания механизмов регуляции внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах. Разработанный в данной работе теоретико-экспериментальный подход исследования тромбоцитов может быть использован для анализа тромбоцитов пациентов с широким спектром нарушений функциональности тромбоцитов.

Содержание автореферата полностью соответствует основным защищаемым положениям диссертации. Результаты работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, в том числе – в 7 публикациях, входящих в международные базы данных Scopus и Web of Science, а также были представлены на научных конференциях международного и российского уровня.

По сведениям, представленным в автореферате, можно утверждать, что диссертационная работа Мартянова А.А. «Исследование механизмов регуляции активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI» является законченным научно-квалификационным трудом и соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК Минобрнауки России (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, в ред. Постановления Правительства РФ от

26.09.2022 № 1690), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Мартьянов А.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. – «биофизика».

Яковенко Леонид Владимирович
17 ноября 2022 г.

Ученая степень и звание: доктор физико-математических наук, доцент
Место работы: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», физический факультет, кафедра биофизики.

Должность: профессор.

Адрес: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В.Ломоносова, дом 1, строение 2, физический факультет.

Телефон: +7(495)939-30-07.

Адрес электронной почты: yakovenko.lv@physics.msu.ru

Подпись профессора Яковенко Леонида Владимировича удостоверяю:



Корашевская К.М.

