

ФМБА России

**Федеральное государственное бюджетное
учреждение
«Федеральный научно-клинический центр
Физико-химической медицины
Федерального медико-биологического
агентства»
(ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1А
Телефон/факс: +7 (499) 246-4409
<http://rcpcm.org/> E-mail: info@rcpcm.org**

17.10.2022 № 1742

УТВЕРЖДАЮ

Ио генерального директора
Федерального государственного
Бюджетного учреждения
«Федеральный научно-клинический центр
Физико-химической медицины
Федерального медико-биологического
агентства»
Член-корр. РАН, д.б.н., профессор
Лагарькова Мария Андреевна



«17» октября 2022 г.

Отзыв

ведущей организации на диссертацию 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.

Актуальность темы выполненной работы

Патологический тромбоз, связанный с усиленной активностью тромбоцитов и повышенным внутрисосудистым свертыванием крови, – частая и непосредственная причина смерти. Тромбоциты выполняют в норме защитную функцию по предотвращению кровотечения в месте повреждения кровеносного сосуда. Здесь тромбоциты активируются, агрегируют, образуют первичный белый тромб, а затем в результате свертывания крови формируется конечный тромб. Однако при многих патологических состояниях происходит внутрисосудистая стимуляция тромбоцитов, они становятся гиперактивными. Это происходит, например, при операциях, разрыве атеросклеротических бляшек, в результате поступления в кровь агонистов из других тканей и т.п. Внутрисосудистое тромбообразование во многих случаях лежит в основе острого нарушения кровообращения при ряде сердечно-сосудистых заболеваний (ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, острый коронарный синдром).

Диссертационная работа Мартьянова А.А. посвящена изучению механизмов активации тромбоцитов через рецепторы, ассоциированные с тирозинкиназами. Учитывая, что сердечно-сосудистые заболевания до сих пор остаются основной причиной смертности, а также принимая во внимание, что механизм регуляции активации тромбоцитов до сих пор далек от своего решения, постановка указанной цели является своевременной, а саму работу следует признать актуальной.

Общая характеристика и структура диссертационной работы

Структура диссертационной работы Мартьянова А.А. традиционна. Она изложена на 128 странице, состоит из введения, обзора литературы, материалов и

методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов. Работа хорошо проиллюстрирована и также включает список литературы, состоящий из 203 литературных источников.

Во Введении приведены разделы, описывающие актуальность исследования, степень разработанности темы, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, также здесь приведены цель и задачи исследования, список тезисов докладов, представленных на конференциях.

Глава 1 – Обзор литературы, в котором приведены сведения о физиологических функциях тромбоцитов, рассмотрены этапы внутриклеточной сигнализации, подробно описана тирозинкиназная сигнализация в тромбоцитах, запускаемая лектиновым рецептором CLEC-2, либо рецептором гликопротеидом GPVI. Освещены современные данные о теоретических подходах к описанию активации тромбоцитов, также автор рассматривает существующие математические модели внутриклеточной сигнализации. Обзор литературы актуален по тематике, достаточно емкий, содержит последние данные в исследуемой области, что показывает высокую степень эрудированности автора.

В главе 2 – Материалы и методы – описаны использованные в работе методы. Активацию исследуемых рецепторов (тем самым тромбоцита в целом) осуществляли полисахаридом фукоиданом (рецептор CLEC-2) и пептидом (рецептор GPVI), который по действию подобен коллагену. Следует отметить, что автор владеет современными методами исследования, таким как вестерн-блоттинг, иммунофлуоресцентный анализ, проточная цитометрия. В работе достаточно подробно описаны принципы разработки теоретических моделей. Использованные автором методы адекватны поставленным задачам и демонстрируют хороший методический уровень диссертационного исследования.

Результаты и их обсуждение представлены в главе 3 «Исследование динамических характеристик CLEC-2-индуцированной сигнализации» и главе 4 «Сравнение GPVI- и CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах в норме и при патологии». В этих главах описаны полученные в ходе решения поставленных задач теоретические и экспериментальные данные, проведен их анализ, обсуждены возможные направления дальнейших изысканий в исследуемой области.

Из полученных данных следует отметить исследование динамических характеристик тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах. Автору удалось построить кинетическую модель активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI, учитывающую не только активацию тирозинкиназ, запуск кальциевой и фосфоинозитидной сигнализации, но и кластеризацию рецепторов в мембране тромбоцита. Предсказание теоретической модели о значимости кластеризации рецепторов CLEC-2 для дальнейшей сигнализации было подтверждено экспериментальными методами. В работе продемонстрировано влияние температуры на отдельные сигнальные пути в тромбоцитах, также показано, что степень насыщения мембраны тромбоцитов холестерином влияет на скорость активации тромбоцитов, что соответствует предсказаниям модели.

Полученные результаты расширяют наше понимание механизмов активации тромбоцитов в норме и при патологии. Разработанный метод анализа кальциевой сигнализации позволяет оценивать первичную внутриклеточную сигнализацию в тромбоцитах как здоровых доноров, так больных с тромбоцитопенией. Результаты работы могут послужить основой для создания тест-систем, направленных на скрининг антиагрегантов и других веществ – потенциальных регуляторов активации тромбоцитов.

Последняя глава работы – Заключение – описывает суть полученных результатов и содержит выводы по проделанной работе.

По результатам, представленным в диссертационной работе, опубликованы 7 статей в международных рецензируемых журналах, представлены тезисы докладов на 10 российских и международных конференциях.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

В представленной работе была разработана экспериментальная методика наблюдения первичного кальциевого ответа тромбоцитов на стимуляцию рядом активаторов. Показано, что ключевыми этапами активации тромбоцитов через ассоциированные с тирозинкиназами рецепторы являются кластеризация рецепторов и сборка LAT-сигнасомы. Кроме того, установлено, что температура и насыщение мембраны тромбоцитов холестерином оказывают влияние на CLEC-2-индуцированную сборку LAT-сигнасомы и внутриклеточную сигнализацию.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Примененные автором современные молекулярно-биологические и цитологические методы адекватны поставленным задачам. Представленные в работе результаты достоверны, сделанные выводы обоснованы и подтверждены экспериментальными данными. Все это позволяет сделать вывод о репрезентативности результатов и выводов диссертации. Представленные в автореферате и публикациях результаты полностью отражают проведенные диссертантом исследования.

По диссертации принципиальных замечаний нет. Однако, она содержит немало неточностей и неясностей, которые в основном относятся к оформлению, но сильно усложняют чтение.

- (1) Не понятно, почему для сокращенного названия пептида, действующего на тромбоциты как коллаген, использовано буквосочетание CRP. Это сокращение, в русском и в английском языках, обозначает С-реактивный белок.
- (2) На рис.2.3 ось ординат странная по названию, а в подписи говорится «флуоресцентном сигнале» вместо того, чтобы указать его физическую величину.
- (3) На рис. 3.3 представлены экспериментальные данные из литературы для сравнения с расчетными размерами кластеров. Экспериментальные данные совсем не объяснены, не понятны в сравнении с расчетами.
- (4) На рис. 3.12 (правая часть) по оси ординат отложена величина «Интенсивность

РУ20». Поскольку РУ20 - белок, получается нонсенс.

(5) В формуле (3.4, стр. 60) постоянная Больцмана и константа скорости реакций обозначены одной буквой.

(6) В таблице А.5 (приложение) в одном из столбцов приведены математические выражения, а столбец назван «Уравнения».

Указанные замечания не влияют на выводы диссертации и не снижают научной ценности представленной работы.

Заключение

Диссертационная работа Мартьянова А. А. на тему «Исследование механизмов регуляции активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI» по актуальности темы, объему выполненной работы, новизне полученных данных, важности разработанных теоретических и практических положений, надежности полученных результатов и обоснованности выводов полностью соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016г № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г № 650; от 20.03.2021 г. № 426), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки).

Отзыв на диссертационную работу Мартьянова Алексея Александровича «Исследование механизмов регуляции активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI» обсужден на заседании отдела биофизики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России 12 октября 2022 года, протокол № 10.

Составитель отзыва Мурина Марина Алексеевна, доктор биологических наук, профессор (по специальности «биофизика»), главный научный сотрудник отдела биофизики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России.



_____ (М.А. Мурина)

Рабочий тел., факс: +7 (499) 246-43-52;

e-mail: marina_murina@mail.ru

Подпись Муриной Марины Алексеевны заверяю
Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России,
кандидат биологических наук



_____ (Т.Н. Грибова)