

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Мартьянова Алексея Александровича на тему «Исследование механизмов регуляции активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPIIb/IIIa», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа Мартьянова А.А. посвящена исследованию сигнализации через рецепторы тромбоцитов CLEC-2 (C-type lectin like receptor 2, лектиноподобный рецептор С типа 2) и гликопротеин (GPIIb/IIIa). В качестве основного методического подхода автором было выбрано построение компьютерных моделей для анализа работы этих рецепторов. Подобные модели позволяют определять такие важные характеристики процессов сигнализации, как лимитирующие стадии, скорости отдельных реакций и их изменения при вариациях количества рецептора, температуры, состава мембраны, и других параметров. Известно, что единственным естественным лигандом, активирующим CLEC-2, является мембранный белок подоплатин, экспрессирующийся эндотелиальными клетками лимфатических сосудов и некоторыми другими клетками, локализованными вне кровеносного сосудистого русла. Ранее было установлено, что взаимодействие CLEC-2 тромбоцитов с подоплатином необходимо для разделения лимфатической и кровеносной системы в процессе эмбриогенеза. В то же время роль этого рецептора в процессах гемостаза и тромбоза во взрослом организме остается неясной. Малоизученными являются и некоторые аспекты сигнализации через CLEC-2, в частности закономерности мобилизации внутриклеточного кальция. Также в литературе отсутствуют теоретические модели, описывающие процессы сигнализации, опосредованные CLEC-2. GPIIb/IIIa изучен существенно подробнее CLEC-2. Этот белок является главным в процессе активации тромбоцитов коллагеном, компонентом матрикса, обнажающимся при повреждении эндотелия сосудов, и играет критическую роль в формировании гемостатической бляшки и внутрисосудистых тромбов. Однако, полноценные модели, учитывающие отдельные стадии формирования, проведения и распространения активирующего сигнала через этот рецептор на сегодняшний день также отсутствуют. Таким образом, целью настоящей работы, определяющей ее научную актуальность и новизну, стала разработка математических, компьютерных моделей функционирования CLEC-2 и GPIIb/IIIa с учетом отдельных стадий (кластеризация рецептора, фосфорилирование внутриклеточных

сигнальных белков, образование комплексов сигналом, мобилизация кальция), и проверка корректности этих моделей в эксперименте.

Научная новизна и практическая значимость диссертационной работы

Основная часть работы Мартыянова А.А. посвящена разработке и проверке постадийной модели сигнализации через рецептор CLEC-2. Такая модель для данного рецептора была создана впервые, что определяет научную новизну этого раздела работы. На основании уже известных данных о работе CLEC-2 в качестве основных стадий сигнализации были выбраны: кластеризация рецептора, следующая за его связыванием с лигандом и необходимая для проведения сигнала внутрь тромбоцита, активация тирозинкиназы и фосфорилирование внутриклеточных субстратов этого фермента, активация фосфолипазы C и последующее образование инозитолтрифосфата, который в свою очередь вызывает повышение концентрации цитозольного кальция. Для описания каждой стадии были разработаны отдельные модули уравнений, которые на завершающем этапе были объединены в общую модель CLEC-2-зависимой активации тромбоцитов. Основные параметры, необходимые для построения модели, такие как количество CLEC-2, количество внутриклеточных белков сигнализации, некоторые геометрические показатели (площадь плазматической мембраны тромбоцита, объем его внутриклеточного пространства и цитозоля в частности) были взяты из литературных источников. Корректность модели была проверена на основании известных литературных данных по кластеризации CLEC-2 и фосфорилированию внутриклеточных сигнальных молекул, а затем и на основании результатов собственных экспериментальных исследований. В экспериментах были использованы современные и адекватные для изучения процессов сигнализации методы: оценка фосфорилирования субстратов тирозинкиназы с помощью иммуноблоттинга, иммунофлуоресцентная визуализация образования сигналом, измерение мобилизации кальция с помощью проточной цитометрии. В связи с трудностью использования мембранного белка подопланина в качестве лигандов CLEC-2 были использованы ранее апробированные нефизиологические агонисты - полисахарид фукоидан и белок из яда змей родоцитин. Все проведенные эксперименты подтвердили правильность предложенной автором математической модели, а также впервые показали, что активация CLEC-2 стимулирует мобилизацию кальция в тромбоцитах. Модель позволила правильно описать замедление стимулированных фукоиданом процессов сигнализации в тромбоцитах при снижении температуры и при частичном удалении мембранного холестерина с помощью с помощью холестерин-связывающего агента mβCD. Такие замедления были зарегистрированы при измерении фосфорилирования субстратов тирозинкиназы, образования LAT-сигналом и мобилизации кальция. Далее

автор перенес модель, разработанную для CLEC-2, для анализа сигнализации стимулированной при активации GPIIb/IIIa. Были сделаны соответствующие поправки, учитывающие большее количество молекул GPIIb/IIIa на мембране, специфические ассоциации с дополнительным ITAM доменом и некоторыми внутриклеточными киназами. Модель для GPIIb/IIIa была валидирована по уровню активных Syk киназы на основании литературных данных и по уровню мобилизации кальция на основании самостоятельно полученных данных при активации тромбоцитов CRP (collagen-related peptide, пептид, родственник коллагену). Анализ процессов сигнализации с помощью предложенных моделей позволил автору сделать принципиальный вывод о том, что кластеризация CLEC-2 и GPIIb/IIIa является одной из лимитирующих стадий в процессе проведения и распространения сигнала через эти рецепторы. И наконец в последней части работы были проанализированы некоторые аспекты кальциевой сигнализации через рецепторы GPIIb/IIIa у здоровых доноров и через CLEC-2 у здоровых доноров в сравнении с пациентами с капошиформной гемангиоэндотелиомой (КГЭ), редким сосудистым новообразованием с высоким уровнем экспрессии лиганда CLEC-2 подопланина в опухолевых клетках. Автором была обнаружена существенная вариация кальциевой мобилизации в тромбоцитах здоровых доноров в ответ на максимальные дозы CRP, лиганда GPIIb/IIIa, и специфическое снижение мобилизации кальция в тромбоцитах больных КГЭ в ответ на родоцитин, лиганд CLEC-2. По предположению автора оба явления были связаны с изменениями количества соответствующих рецепторов на мембране тромбоцитов. Для GPIIb/IIIa это может быть следствием физиологических вариаций, а для CLEC-2 - следствием удаления из кровотока тромбоцитов с высоким содержанием этого белка за счет их задержки в опухоли с высоким уровнем экспрессии лиганда CLEC-2 подопланина. Приложение математических моделей для объяснения этих результатов показало, что существенные изменения максимальных кальциевых ответов соответствуют вариациям количества рецепторов в диапазонах, наблюдаемых у здоровых доноров, а также при их более низких количествах, как например у больных с тромбоцитозом для GPIIb/IIIa и у больных с КГЭ для CLEC-2. Эти данные косвенно подтверждают предположение о влиянии количества этих рецепторов на поверхности тромбоцитов на амплитуду кальциевых ответов.

Совокупность оригинальных данных полученных Мартыновым А.А. расширяет наши знания о процессах сигнализации тромбоцитов, запускаемых при связывании лигандов с CLEC-2 и GPIIb/IIIa, что обуславливает, как теоретическую, так и практическую значимость представленной работы. Количество и качество новых результатов вполне

достаточно для кандидатской диссертации и соответствует специальности 1.5.2.

Биофизика.

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных результатов определяется в первую очередь приведенными доказательствами корректности предлагаемых теоретических моделей для функционирования рецепторов CLEC-2 и GPIIb/IIIa тромбоцитов. Такие доказательства были получены, как с использованием литературных, так и самостоятельно полученных экспериментальных результатов. Собственно экспериментальные результаты были получены с помощью адекватных поставленным задачам методов изучения сигнализации тромбоцитов и их достоверность была подтверждена корректным статистическим анализом.

Структура и объем диссертации

Диссертация Мартянова А.А. изложена на 128 страницах, содержит 40 рисунков, 4 таблицы и 203 литературных источника. В рукописи выделены следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы» (Глава 1), «Материалы и методы» (Глава 2), «Исследование динамических характеристик CLEC-2 индуцированной сигнализации» (Глава 3), «Сравнение GPIIb/IIIa- и CLEC-2-индуцированной сигнализации в норме и патологии» (Глава 4), «Заключение», «Выводы», «Список сокращений и условных обозначений», «Список литературы» и одно «Приложение с описанием моделей рецептора CLEC-2». Таким образом в диссертации отсутствуют традиционные разделы «Результаты собственных исследований» и «Обсуждение результатов», а самостоятельно полученные данные вместе с их обсуждением изложены в двух тематически разделенных главах 3 и 4. Такое разделение представляется обоснованным, т.к. глава 3 содержит в основном результаты разработки модели сигнализации и ее экспериментальные подтверждения, а Глава 4 – клинически ориентированные исследования сигнализации тромбоцитов здоровых доноров и пациентов. Глава 1 «Обзор литературы» указывает на детальное знание автором не только сложных вопросов сигнализации тромбоцитов, но и возможностей математического моделирования этих процессов. Глава 2 «Материалы и методы» написана достаточно подробно для воспроизведения экспериментальных методик, а конкретное описание математических уравнений, использованных при построении моделей перенесено в «Приложение». Диссертация подробно иллюстрирована (40 рисунков), что упрощает понимание изложенного материала. Раздел «Заключение» суммирует полученные результаты и возможности предложенных математических моделей. Выводы работы конкретны и отражают основные полученные результаты. В целом и диссертация, и автореферат написаны хорошим языком, а количество опечаток и

стилистически неудачных выражений не превышает критический уровень, затрудняющий восприятие работы.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано семь статей, в том числе три в высокорейтинговых международных журналах (“Biophysical Journal”, “Life”, International Journal of Molecular Sciences”). Материалы диссертационной работы неоднократно докладывались на крупных международных и отечественных конгрессах и конференциях (10 тезисов докладов).

Вопросы и замечания

По диссертационной работе возникло несколько вопросов и замечаний.

1. Насколько корректным является использование уравнения Михаэлиса-Ментен для модельного описания внутриклеточных процессов с участием, в том числе, мембранных белков, ферментов входящих в состав комплексов, и в условиях, когда локальные концентрации субстратов (например, фосфорилируемых белков) могут быть потенциально сравнимы с концентрациями ферментов (например, различных киназ) ?
2. В сигнальных процессах, запускаемых лигандами CLEC-2 и GPIIb/IIIa, могут участвовать не только эти рецепторы, но и эндогенные агонисты, образующиеся в тромбоцитах при их активации, главные из которых АДФ, секретируемый из плотных гранул, и тромбоксан A₂, образующийся вследствие ферментативных превращений арахидоновой кислоты. Почему автором не были проведены прямые (и достаточно простые) эксперименты с использованием известных блокаторов рецепторов АДФ (в частности, блокатора P2Y₁₂ рецептора АДФ тикагрелора) и ингибиторов синтеза тромбоксана A₂ (аспирина или индометацина) для исследования участие этих соединений в CLEC-2- и GPIIb/IIIa-зависимых сигнальных реакциях ?
3. Почему автором не были выполнены прямые измерения количества GPIIb/IIIa у здоровых доноров и количества CLEC-2 у здоровых доноров и пациентов с КГЭ ? Такие эксперименты (требующие лишь наличия специфических антител) позволили бы проверить обоснованное предположение о зависимости кальциевой мобилизации от количества изучаемых рецепторов на поверхности тромбоцитов и избежать термин «предположительно» в выводе 3.

Конкретные замечания по тексту и оформлению работы:

1. Отдельные подписи к рисункам содержат неполную информацию для их описания. Не всегда указаны количество наблюдений (см., например, все рисунки в Главе 4), а в рисунках, представляющих результаты других авторов для валидации моделей, иногда не

указаны методы с помощью которых были получены экспериментальные результаты (см., например, рис. 3.3, 3.8, 3.24).

2. В тексте диссертации присутствует ряд стилистически неудачных и неточных выражений. Неоднократно говорится о «секреции гранул», хотя речь идет о секреции содержимого тромбоцитарных гранул вследствие их экзоцитоза и слияния с плазматической мембраной. Также представляется не совсем грамотным часто используемое выражение «получено, что» вместо «показано, что» или «продемонстрировано, что». Возможно следовало бы подумать об адекватном переводе и/или разъяснении для каждого конкретного случая часто применяемого (в том числе в выводе 1) англоязычного термина «паттерн», который может подразумевать, любые особенности, как количественные, так и качественные описываемого объекта и/или явления (например, кластеров и кластеризации).

3. Среди досадных опечаток следует обозначить пропуск слова «агонистов» в выводе 3 (высокими концентрациями агонистов GPIIb/IIIa, а не высокими концентрациями GPIIb/IIIa), и использования (несколько раз) термина «насыщение» холестерином при действии агента mβCD вместо «удаление» или «снижение» концентрации холестерина.

Нужно отметить, что поставленные вопросы имеют дискуссионный характер, а замечания по тексту касаются формальных аспектов представления материала. Эти вопросы и замечания никак не умаляют научную ценность работы и качество полученных результатов.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Мартьянова Алексея Александровича «Исследование механизмов регуляции активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPIIb/IIIa», представляет собой законченное научно-квалификационное исследование, в котором решена актуальная медико-биологическая задача по анализу закономерностей сигнализации тромбоцитов при их активации агонистами, воздействующими на CLEC-2 и GPIIb/IIIa. По своей научной новизне, обоснованности, теоретической и практической значимости полученных результатов и сделанных выводов, а также по высокому, современному методическому уровню она полностью соответствует п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, с изменениями постановления правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, в редакции постановления правительства РФ от 1 октября 2018 г. № 1168, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук и паспорту заявленной специальности 1.5.2. Биофизика, а ее

автор, Мартьянов Алексей Александрович заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

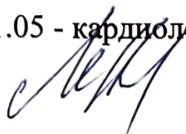
Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник, и.о. руководителя лаборатории клеточной адгезии
Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,

доктор медицинских наук по специальностям

03.01.04 - биохимия и 14.01.05 - кардиология,

профессор



Мазуров Алексей Владимирович

Адрес: 121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а

Контактный телефон: +7 (916) 6270543 (моб); +7 (495) 4146735 (раб)

Электронный адрес: avmazurov@list.ru

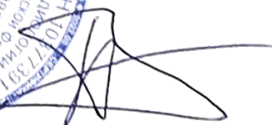
Подпись Мазурова Алексея Владимировича заверяю

Ученый секретарь Института экспериментальной кардиологии

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика
Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

д.м.н.

Плеханова Ольга Сергеевна



«01» ноября 2022 г.