

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.038.01,  
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ  
ИНСТИТУТА  
БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ ИМ. Н.М. ЭМАНУЭЛЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА  
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 23.11.2022 г., № 10

О присуждении Мартьянову Алексею Александровичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

**Диссертация** «Исследование механизмов регуляции активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI» по специальности 1.5.2. Биофизика принята к защите 21 сентября 2022 года (протокол заседания № 6) диссертационным советом 24.1.038.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4; приказ Министерства образования и науки № 105/нк от 11 апреля 2012 года.

**Соискатель** – Мартьянов Алексей Александрович, «31» октября 1995 года рождения. В 2019 году соискатель окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по специальности «биофизика». С 03 октября 2019 года 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 1.5.2. Биофизика.

С 2017 года по настоящее время работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации в должности младшего научного сотрудника и по совместительству в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук в должности научного сотрудника.

**Диссертация выполнена** в лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН).

**Научный руководитель** – доктор физико-математических наук **Свешникова Анастасия Никитична**, заведующий лабораторией внутриклеточной сигнализации и системной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук 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 (ИБХФ РАН).

**Официальные оппоненты:**

**Мазуров Алексей Владимирович**, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, и.о. руководителя лаборатории клеточной адгезии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Федерации;

**Колесников Станислав Сергеевич**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной физиологии клетки Института биофизики клетки Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

**дали положительные отзывы на диссертацию.**

**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» в своём **положительном отзыве**, подписанном Муриной Мариной Алексеевной, доктором биологических наук, главным научным сотрудником отдела биофизики и утвержденном и.о. генерального директора Центра, доктором биологических наук, профессором Лагарьковой Марией Андреевной указала, что диссертация является актуальной, поскольку сердечно-сосудистые заболевания до сих пор остаются основной причиной смертности, и посвящена изучению механизмов активации тромбоцитов через рецепторы, ассоциированные с тирозинкиназами. 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-сигналысомы. Кроме того, установлено, что температура и насыщение мембраны тромбоцитов холестерином оказывает влияние на CLEC-2 индуцированную сборку LAT-сигналысомы и внутриклеточную сигнализацию. В заключении отмечено, что 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» диссертационная работа Мартьянова А.А. отвечает требованиям в пунктах 9–14 ВАК Минобрнауки России (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. №335; 02.08.2016 г. №748; от 29.05.2017 г. №650; и от 20.03.2021г. №426), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Соискатель имеет 17 опубликованных работ по теме диссертации, из них: 7 публикаций представлено в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, из которых 7 – в журналах, входящих в международные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus; 10 публикаций в российских и международных сборниках трудов и материалов научных конференций.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

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. Sveshnikova // 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. Sveshnikova // Life. 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  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  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. Sveshnikova // International Journal of Molecular Sciences. 2020. – Vol. 21. – № 9. – P. 3035. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21093035> (Scopus: 5.838; WOS: 4.556)

На автореферат поступило **3** положительных отзыва: **1)** отзыв д.ф.-м.н. Яковенко Леонида Владимировича, профессора кафедры биофизики, физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» без замечаний; **2)** отзыв к.ф.-м.н. Кузнецовой Софьи Алексеевны, ведущего научного сотрудника лаборатории биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр Детской гематологии онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачёва» Министерства здравоохранения Российской Федерации без замечаний; **3)** в отзыве к.б.н. Балацкой Марии Николаевны, старшего научного сотрудника Факультета фундаментальной медицины, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» приводится ряд следующих замечаний и пожеланий: требуется указать параметры сравнения теоретических и экспериментальных данных, уточнить причины, по которым в качестве контроля была использована  $mQ$ , поскольку добавление значительного количества воды приводит к изменению осмолярности раствора, уточнить, каким образом с терапевтической точки зрения можно было бы использовать тот факт, что количество рецепторов CLEC-2 на тромбоцитах пациентов с КГЭ снижено, а также замечания технического и редакционного характера.

В отзывах отмечено, что тема диссертации является актуальной и междисциплинарной, в работе разработана перспективная теоретико-экспериментальная методика исследования внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах здоровых доноров и пациентов с онкогематологическими

заболеваниями. Показано, что регуляция внутриклеточной тирозинкиназной сигнализацией осуществляется за счёт кластеризации рецепторов тромбоцитов, инициирующих данную сигнализацию. Помимо этих результатов впервые показано, что наблюдается значительная вариабельность ответов тромбоцитов здоровых доноров на активацию их через рецептор GPVI, что, согласно теоретическим предсказаниям, может быть связано с вариабельностью по количеству рецепторов GPVI на поверхности тромбоцитов здоровых доноров. Также показано, что у пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой наблюдается дисфункция CLEC-2 индуцированной активации тромбоцитов, предположительно, связанная со снижением количества уровней CLEC-2 на тромбоцитах. Все сделанные выводы обоснованы и соответствуют полученным результатам, имеющим важное как фундаментальное, так и прикладное значение, а работа соответствует специальности 1.5.2. Биофизика.

**Выбор официальных оппонентов и ведущей организации** обосновывается их специализацией по проблеме настоящей диссертационной работы и достижениями в области биофизики, физиологии и молекулярной сигнализации, а также наличием публикаций в соответствующей сфере исследования, что позволяет им оценить научную и практическую ценность диссертации. Оппонент д.м.н. Мазуров А.В. является ведущим специалистом в области активации и функционирования тромбоцитов в норме и при патологиях. Оппонент д.б.н. Колесников С.С. является одним из признанных специалистов в области биофизики клетки, а также теоретических и экспериментальных методов исследования внутриклеточной сигнализации.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» является одним из лидеров в области регуляции внутриклеточной сигнализации в

клетках человека.

**Диссертационный совет** отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

**разработана** экспериментальная методика динамического исследования внутриклеточной кальциевой сигнализации в тромбоцитах и активации их интегринов при стимуляции тромбоцитов различными типами агонистов;

**предложены** механизмы дисфункции тромбоцитов пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой, заключающиеся в снижении количества рецепторов CLEC-2 на поверхности тромбоцитов пациентов;

**доказана** значимость процесса кластеризации рецепторов CLEC-2, инициирующих тирозинкиназную сигнализацию в тромбоцитах для нормальной инициации кальциевой сигнализации.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что доказано,** что кластеризация рецепторов в мембранах тромбоцитов наравне с активацией тирозинкиназ и формированием LAT-сигнаლოსомы является одной из скорость-лимитирующих стадий для CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах;

**применительно к проблематике диссертации результативно использован** теоретико-экспериментальный подход для исследования широкого спектра биологических сигнальных систем как в тромбоцитах, так и в других клетках; **разработан** теоретический подход, который может быть использован для исследования механизмов развития гематологических заболеваний и исследования эффектов различных вариантов терапии на функцию тромбоцитов пациентов;

**изучено** влияние температуры и концентрации холестерина в мембранах тромбоцитов на их активацию через рецептор CLEC-2: снижение как температуры, так и концентрации холестерина замедляет процесс активации тромбоцитов.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики** подтверждаются тем, что:

**разработана** экспериментальная методика, которая может быть использована для исследования внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах здоровых доноров и пациентов, что позволит идентифицировать механизмы развития нарушений функции тромбоцитов; **определены** причины нарушения CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах у пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой, связанные со снижением количества рецепторов CLEC-2 на поверхности тромбоцитов;

**представлены** экспериментальные данные, подтверждающие, что вариабельность ответов здоровых доноров может быть связана с вариабельностью количества рецепторов GPVI на поверхности тромбоцитов.

**Оценка достоверности** результатов исследования выявила следующее:

**для экспериментальных работ** результаты получены на сертифицированном оборудовании с применением современных экспериментальных методов исследований в области биофизики клетки, стандартных методик обработки результатов; обоснован выбор проточной цитометрии, флуоресцентной микроскопии и вестерн-блоттинга в качестве основных методов анализа внутриклеточной кальциевой сигнализации в тромбоцитах;

**теория** о значимости кластеризации рецепторов CLEC-2 для активации тромбоцитов основывается одновременно на результатах математического моделирования, а также на имеющихся литературных данных о последовательности событий, происходящих после связывания CLEC-2 со своими активаторами (фукоиданом);

**идея** базируется на анализе и обобщении литературных данных по исследованию внутриклеточной тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах здоровых доноров и пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой;

**использованы** авторские данные и данные, полученные и опубликованные другими исследователями, по рассматриваемой тематике;

**установлено** соответствие авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках, по динамике внутриклеточной кальциевой сигнализации в тромбоцитах при активации их через рецепторы CLEC-2 и GPVI, а также по вариабельности количеств рецепторов GPVI на тромбоцитах здоровых доноров;

**использованы** современные методы исследования и обработки данных экспериментальных измерений, в том числе специального программного обеспечения – COPASI, используемого для построения компьютерных моделей, а также с помощью модулей `scipy` и `matplotlib` языка программирования Python 3.8 для статистической обработки данных. Научные положения, результаты и выводы, полученные в диссертации, достоверны и полностью подтверждаются экспериментальными данными, а также получили признание в виде научных публикаций и апробации на научных конференциях.

**Личный вклад соискателя** состоит в непосредственном участии на всех этапах работы: анализе научной литературы, разработке математических моделей CLEC-2- и GPVI-индуцированной сигнализации в тромбоцитах, планировании и проведении экспериментов по проточной цитометрии, постановке экспериментов по вестерн-блоттингу, дизайну и подготовке образцов для экспериментов по флуоресцентной микроскопии, подготовке иллюстраций, написании научных статей и тезисов по материалам работы.

В ходе защиты диссертации были заданы вопросы и высказаны следующие критические замечания:

1. Какой физиологический смысл того, что некоторые сигнальные пути в тромбоцитах зависят от температуры окружающей среды?
2. В разработанной модели присутствует значительное количество неизвестных параметров, а также значимое количество приближений.

Каким образом проводилась валидация модели, строились ли альтернативные модели, между которыми проводился выбор?

Соискатель Мартьянов А.А. ответил на заданные вопросы и привёл собственную аргументацию по критическим замечаниям:

1. В диссертационной работе температурная зависимость CLEC-2 индуцированной сигнализации была продемонстрирована при изменении температуры более чем на 10 °С, что довольно редко встречается в физиологических условиях в одном конкретном организме. Тем не менее, разумно предположить, что при воспалительном ответе может происходить ускорение активации тромбоцитов. Однако, стоит сказать, что варьирование температуры в экспериментах диссертационной работы было использовано скорее для демонстрации значимости диффузии в кластеризации рецепторов CLEC-2.
2. Для подбора неизвестных параметров и валидации модели были использованы доступные из литературы экспериментальные данные, а также данные, полученные в рамках диссертационного исследования. Чтобы избежать ситуации, в которой по одному набору данных приходилось бы подбирать 20 неизвестных параметров, модель была разделена на отдельные модули, а с помощью анализа чувствительности выделены наиболее важные параметры каждого модуля, которые затем и подбирались. Для некоторых модулей, как для модуля кластеризации рецепторов, были разработаны альтернативные модели, и из этих моделей выбиралась наилучшая. Тем не менее, автор диссертации согласен с пожеланием, что в дальнейшем необходимо предоставлять более подробную информацию о статистических критериях выбора тех или иных моделей в работе, а также уделять большее время рассказу о приближениях, использованных для разработки моделей.

**Диссертация** Мартьянова Алексея Александровича «Исследование механизмов регуляции активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и

