

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Мартьянова Алексея Александровича на тему: «Исследование механизмов регуляции активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 биофизика

### **1. Общая характеристика работы**

#### ***1.1. Актуальность проблематики диссертационной работы и ее целесообразность:***

Тромбоциты выполняют ряд важнейших физиологических функций, ключевой из которых является обеспечение блокады утечки крови в месте повреждения сосуда. В силу этого, тромбоцитарная клеточная система всегда была центральным объектом фундаментальных и прикладных исследований системы гемостаза. В значительной степени усилия направлялись на изучение структуры и организации молекулярной машинерии, которая детерминирует способность тромбоцитов распознавать сигналы адгезии и агрегации и быстро формировать в потоке крови в месте повреждения тромб. Были, в частности, выявлены ключевые паракринные и аутокринные факторы, детерминирующие процесс формирования тромба, а также идентифицированы их поверхностные рецепторы и множественные сигнальные белки, которые формируют в тромбоцитах разветвленную систему сигнальных путей.

Представляется, что ключевым в физиологии и патофизиологии тромбоцитов является вопрос, каким образом задаются пороги принятия решения об активации, секреции про-коагулянтных факторов, агрегации, и программируемой гибели. Адекватный ответ вряд ли можно найти без анализа сигнальной машинерии тромбоцитов как динамической системы. Методологический набор для анализа динамики внутриклеточных процессов весьма ограничен. На данный момент ключевыми являются динамические варианты флуоресцентной микроскопии в сочетании с молекулярными зондами и генетически кодируемыми сенсорами, а также математическое моделирование.

Работа Мартьянова А.А. посвящена экспериментальному анализу и математическому моделированию сигнальных процессов, которые инициируются в тромбоцитах при стимуляции поверхностных рецепторов плазмолеммы CLEC-2 и GPVI, сопряженных с тирозинкиназными каскадами. В аналитическом отношении эта область сигнализации в тромбоцитах практически не разработана. Поэтому в целом, актуальность

работы Мартянова А.А. и целесообразность решавшихся в ней задач сомнений не вызывает. В проведенном исследовании использовалась флуоресцентная микроскопия, проточная цитофлуориметрия, флуоресцентные зонды в сочетании с аналитическими подходами и методами вычислительной биофизики. В свете решавшихся в работе задач, использовавшаяся комбинированная методология представляется в целом адекватной.

## *1.2. Стилистика.*

Логика и стилистика изложения материалов в целом удовлетворительны и позволяют понять суть выполнявшихся исследований, их научный базис и методологию. Рисунки достаточно информативны и адекватно иллюстрируют соответствующие положения диссертации и экспериментальные данные. Не являясь исчерпывающим, литературный обзор в целом адекватно отражает существующие представления о рецепторных и сигнальных системах, функционирующих в тромбоцитах. Отмечу, тем не менее, что ряд его положений достаточно формальны и поверхностны. Характерным примером является следующая фраза, которая по информационной ценности близка к случайному набору слов:

«Человеческие тромбоциты также экспрессируют несколько диацилглицерин киназ (DGK), ответственных за остановку сигнализации от ДАГ. Ингибирование DGK ослабляет кальциевые ответы тромбоцитов на активацию, что подчёркивает значимость ДАГ для внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах».

Между тем, без особых усилий можно было бы уточнить, что DGK фосфорилирует DAG, конвертируя его в фосфатидную кислоту, которая сама является вторичным медиатором. Поэтому упомянутый в цитируемой работе эффект ингибирования DGK свидетельствует о том, что упомянутая в цитируемой работе  $Ca^{2+}$  сигнализация охвачена отрицательной обратной связью при участии либо DAG либо фосфатидной кислоты.

Отмечу, что физиологическая роль DGK шире таковой, слегка обозначенной в обзоре: DGK вовлечена в формирование точки бифуркации, в которой внутриклеточная сигнализация при участии DAG либо терминируется, либо конвертируется из DAG-зависимого процесса в процесс, регулируемый фосфатидной и/или арахидоновой кислотой.

## ***2. Основополагающие научные результаты и их значимость.***

В сонме полученных в работе результатов следующие представляются ключевыми:

2.1. В терминах математического моделирования впервые формализованы внутриклеточные сигнальные процессы в тромбоцитах, инициируемые при активации рецепторов CLEC-2 и GPVI, в том числе кластеризация рецепторов, их сопряжение с каскадом тирозинкиназ и последующая мобилизация внутриклеточного  $Ca^{2+}$ .

2.2. Выдвинута правдоподобная гипотеза, что кластеризация рецепторов может быть скоростью-лимитирующей при стимуляции тирозинкиназного каскада. Данный вывод подкреплён сравнительным анализом экспериментальных и симулируемых ответов клеток.

2.3. С использованием проточной цитофлуориметрии впервые было показано экспериментально, что в тромбоцитах рецептор CLEC-2 может сопрягаться с мобилизацией  $Ca^{2+}$ .

2.4. Экспериментально продемонстрировано, что  $Ca^{2+}$  ответы тромбоцитов здоровых доноров на GPVI-зависимую активацию значительно варьируют. Предложено объяснение этого феномена в терминах модели, в соответствии с которым вариабельность клеточных ответов является следствием девиации поверхностной плотности GPVI.

В целом, научная ценность проведенных исследований, эффективность использовавшейся методологии и важность полученных результатов несомненны. По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 7 статей в рецензируемых журналах. Многие основополагающие, в ряде случаев пионерские, результаты работы были представлены в высокорейтинговых международных научных журналах, таких как *Biophysical Journal*, *Life*, *International Journal of Molecular Sciences*, и, следовательно, прошли достаточно жесткую научную экспертизу.

## ***3. Вопросы и замечания.***

Хотя в целом работа А.Е. Мартьянова достаточно ясно изложена при достаточном уровне детализации, ряд ее положений вызывает вопросы и замечания. Основное сводится к материалам, изложенным в Главе 3, в которой анализировался предполагаемый вклад кластеризации CLEC-2 рецепторов в ответ тромбоцита на стимуляцию соответствующим лигандом.

3.1. Опираясь на теорию Смолуховского, развитую для анализа процесса быстрой коагуляции, автор предложил уравнения для описания кластеризации CLEC-2. Между тем, помимо модели Смолуховского, имеется модель Мюллера, которая была разработана чтобы объяснить автокаталитический характера коагуляции. Представляется, что ускорение кластеризации за счет ускорения ассоциации мономеров с кластерами все увеличивающихся размеров, что физически обосновано, было бы физиологически целесообразно как процесс, ускоряющий ответ тромбоцита.

3.2. При верификации предложенной модели диссертант опирается на зависимость диффузии от температуры. При этом автор использует формулу Аррениуса для температурной зависимости коэффициента диффузии  $D$  от температуры  $T$ , что работает при вакантном механизме и преимущественно в твердых телах. В жидкостях более точные оценки дает формула Эйнштейна-Стокса, предполагающая прямую пропорциональность  $D$  и  $T$ . Это почти работает и в липидах вдали от фазового перехода, т.е. в условиях, использовавшихся в экспериментах диссертанта:  $D \sim T^n$ , где  $1 < n < 2$ .

Далее, автор использует следующую логику: если диффузия лимитирует кластеризацию CLEC-2, то повышение температуры должно ее ускорять. Отмечу, что это справедливо только при необратимой кластеризации. Между тем, формирование кластеров разных размеров описывается диссертантом как обратимая бимолекулярная реакция при одних и тех же константах скорости ассоциации и диссоциации для разных кластеров. Отмечу, что для диффузионно-лимитируемой ассоциации температурный коэффициент  $Q_{10} \approx 1.2 \div 1.4$ , в то время как для диссоциации  $Q_{10} \approx 2.5 \div 3$ . Как следствие, при бимолекулярном взаимодействии повышение температуры ухудшает афинность связывания и, следовательно, должно снижать средний размер кластера и их количество. Таким образом представляется, что, предложенная модель кластеризации не согласуется с температурной зависимостью результатов, представленных на Рис.6С, которые, следовательно, не могут однозначно рассматриваться как поддерживающие идею о лимитирующей стадии кластеризации CLEC-2.

С другой стороны, киназы в целом являются достаточно медленными ферментами с оборотами в пределах  $1-10 \text{ с}^{-1}$ . Можно поэтому ожидать, что цикл последовательного фосфорилирования в системе CLEC-2-TRK должен протекать медленнее чем кластеризация. Кроме того, эффективность фосфорилирования вполне может расти по мере увеличения размера кластера, развиваясь с задержкой по отношению к кластеризации. и тем самым лимитируя ответ тромбоцита. В этом случае должно наблюдаться именно то, что представлено на Рис.6С.

Эксперименты с  $m\beta CD$ , призванные поддержать идею кластеризации как лимитирующей стадии, можно объяснить тем, что это соединение разрушает рафты, в которых локализованы рецепторы и сигнальные белки, что приводит к их перераспределению по всей поверхности клетки, тем самым драматически меняя кинетику кластеризации CLEC-2 и других процессов, определяющих скорость активации тромбоцитов.

3.3. Существенная часть работы посвящена анализу  $Ca^{2+}$  сигнализации в тромбоцитах как на экспериментальном, так и на теоретическом уровне. В отличие от рецепторного и киназного блоков,  $Ca^{2+}$  блок практически не детализирован в предлагаемой модели. Между тем, IP3 и  $Ca^{2+}$  являются со-агонистами для IP3-рецепторов, и поэтому IP3-зависимый выброс депонированного  $Ca^{2+}$  - это весьма тонкий, нелинейный и нередко регенеративный процесс. Кроме того, 99%  $Ca^{2+}$ , вошедшего из вне или выброшенного из  $Ca^{2+}$  депо, связывается  $Ca^{2+}$  буфером и перехватывается внутриклеточными органеллами. Поэтому внутриклеточная  $Ca^{2+}$  сигнализация не так проста, как это показано на Рис.1.5, и ее моделирование не может сводиться к анализу генерации IP3.

#### ***4. Заключение.***

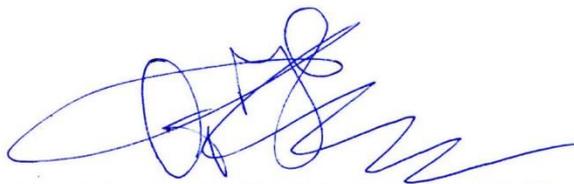
По совокупности использованных методов, уровню поставленных задач и научной значимости полученных результатов работа Мартянова А.А. в целом, представляет собой законченное исследование достаточно высокого уровня, которое выполнено на актуальную тему. Работа характеризуется достаточной новизной и практической значимостью и вносит существенный вклад в существующие представления о роли рецепторов CLEC-2 и GPVI и сопряженных сигнальных каскадов в физиологии тромбоцитов. Получены весомые научные результаты, которые прошли апробацию на российских и международных конференциях и достаточно полно отражены в публикациях в рецензируемых изданиях. Выводы работы конкретны и отражают основные полученные результаты.

По отмеченным выше признакам диссертационная работа «Исследование механизмов регуляции активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI» полностью соответствует всем требованиям («Положение о порядке присуждения ученых степеней» Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. N 842 в действующей редакции от 01 октября 2018 г.), предъявляемым к научным

диссертациям, а ее автор, Мартьянова Алексей Александрович, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности по специальности 1.5.2. Биофизика.

Официальный оппонент

Колесников Станислав Сергеевич



Доктор биологических наук, профессор, заведующий  
Лабораторией молекулярной физиологии клетки  
Института биофизики клетки Российской академии наук  
– обособленное подразделение Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский  
центр «Пущинский научный центр биологических исследований  
Российской академии наук»

Подпись сотрудника ИБК РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН

Станислава Сергеевича Колесникова заверяю

Ученый секретарь ИБК РАН

к.б.н.



Шавкунов К.С.

3 ноября 2022 г.

**Контактные данные:**

тел.: +7(4967)739-121, e-mail: staskolesnikov@yahoo.com

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защита диссертация: 03.01.02 – «Биофизика»

**Адрес места работы:**

142290, Московская область г. Пущино, ул. Институтская, д. 3,  
ФИЦ ПНЦ БИ РАН, Институт биофизики клетки РАН,  
Лабораторией молекулярной физиологии клетки  
Тел.: +7(4967)739-140; e-mail: staskolesnikov@yahoo.com