ОТЗЫВ

официального оппонента доктора физико-математических наук, профессора Соловьёвой Ольги Эдуардовны на диссертацию Коробкиной Юлии Джессики Дмитриевны на тему «Подвижность нейтрофилов вблизи растущего тромба *ex vivo*», представленную в диссертационный совет 99.1.098.02 на базе ФГБУН ЦТП ФХФ РАН, ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика

Актуальность диссертационной работы

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук Коробкиной Юлии Джессики Дмитриевны посвящена исследованию подвижности нейтрофилов вблизи растущего тромба *ex vivo* в условиях, приближенных к физиологическим, с использованием цельной крови. Тромбообразование, процесс на стыке гемостаза, иммунитета и функции эндотелия, играет центральную роль в патогенезе многих сердечно-сосудистых и аутоиммунных заболеваний. Нейтрофилы являются ключевыми клетками, участвующими в этом процессе, и их миграция и взаимодействие с тромбом во многом определяют исход тромбообразования и воспалительной реакции. Существующие методы изучения функции нейтрофилов зачастую используют изолированные клетки, что может приводить к артефактам и неполному пониманию их поведения в сложной среде циркулирующей крови. В связи с этим, разработка и валидация *ex vivo* моделей, позволяющих изучать активность нейтрофилов при их взаимодействии с растущим тромбом и другими компонентами крови, является безусловно актуальной задачей. Особую значимость работе придает исследование механизмов нарушения подвижности нейтрофилов при редких генетических иммунодефицитах, синдроме Швахмана-Даймонда и синдроме Вискотта-Олдрича, что открывает перспективы для понимания патофизиологии этих состояний и разработки новых терапевтических подходов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивались использованием современных и адекватных поставленным задачам методов исследования, таких как флуоресцентная и световая микроскопия живых клеток в проточных камерах, специфическое флуоресцентное мечение клеток, а также математическое моделирование

изучаемых процессов (системы ОДУ, ДУЧП, стохастические модели). Исследования проведены при достаточном количестве экспериментальных повторов, включая образцы крови здоровых доноров и пациентов с редкими заболеваниями. Использованы адекватные методы статистического анализа. Полученные результаты логично вытекают из представленных экспериментальных данных, согласуются с данными мировой литературы, соответствуют цели и задачам, сформулированным автором, подробно описаны в тексте и наглядно представлены на рисунках и в таблицах, присутствующих в работе в достаточном объеме.

Научная новизна и теоретическая значимость работы

В работе Коробкиной Ю.Д. разработана экспериментальная модель *ex vivo* взаимодействия нейтрофилов с растущим тромбом в цельной крови. Впервые экспериментально показано и теоретически обосновано, что движение нейтрофилов в рассматриваемых экспериментальных условиях является хемотаксисом. Разработанный метод практически применим для анализа способности нейтрофилов к направленной миграции. Впервые был проведен анализ взаимодействия нейтрофилов с растущим тромбом в крови пациентов с синдромом Швахмана-Даймонда. Впервые показано, что хемотаксис нейтрофилов у данных пациентов нарушен. Проанализированы особенности регуляции кальцием подвижности нейтрофилов в данной экспериментальной модели. Экспериментально показано, что скорость роста ламеллиподии в нейтрофилах пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича не меняется по сравнению с контрольными клетками здоровых пациентов. В рамках построенной минимальной математической модели актинового цитоскелета ламеллиподии показано, что на скорость роста ламеллиподии нейтрофила не влияет скорость ветвления актина и расстояние до мембраны, на котором происходит ветвление. Показано, что кальций регулирует разборку ламеллиподий, но не их выпячивание при хемотаксисе нейтрофилов. В качестве клеток сравнения изучена кальциевая регуляция движения сперматозоидов, где аналогично с нейтрофилами впервые показано, что кальциевая сигнализация регулирует выбор направления движения клеток.

Практическая значимость

Разработанная экспериментальная методика наблюдения взаимодействия нейтрофилов и тромбоцитов в плоскопараллельной проточной камере может быть использована в практической медицине для оценки подвижности нейтрофилов здоровых доноров и пациентов, что позволит идентифицировать нарушения функции нейтрофилов и оценить механизмы этих нарушений. Специфика и оригинальность разработанной

экспериментальной установки заключается в использовании цельной крови, что исключает влияние методов выделения иммунных клеток на их активность, а также позволяет исследовать взаимодействие нейтрофилов с растущим тромбом в реалистичных условиях. Разработанная модель может быть использована для оценки риска развития нарушений функции нейтрофилов и исследования эффектов различных вариантов терапии на их функцию у конкретных пациентов.

Структура диссертации и автореферата

Диссертация имеет классическую структуру и содержит введение, обзор литературы (глава 1), материалы и методы (глава 2), результаты (глава 3), обсуждение результатов (глава 4), выводы, практические рекомендации, список обозначений и сокращений, список литературы. Список литературы насчитывает 218 источников. Работа представлена на 148 страницах, содержит 37 рисунков и 6 таблиц. Автореферат в полной мере отражает основные положения и выводы диссертации, написан ясно и хорошо иллюстрирован. Результаты работы достаточно полно отражены в опубликованных работах.

Во «Введении» обоснована актуальность исследования подвижности нейтрофилов в контексте тромбовоспаления и связанных с ним заболеваний, а также отмечены ограничения существующих экспериментальных подходов. Сформулированы цель исследования: характеристика подвижности нейтрофилов вблизи растущего тромба *ex vivo* и выявление механизмов ее регуляции, и четыре задачи. Охарактеризованы научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, личный вклад автора. Представлена информация об апробации диссертации.

В «Обзоре литературы» (глава 1) представлен исчерпывающий анализ современных данных по проблеме тромбовоспаления, роли тромбоцитов и нейтрофилов, их взаимодействию и механизмам рекрутирования нейтрофилов. Детально рассмотрены аспекты подвижности эукариотических клеток, включая перестройку цитоскелета, полимеризацию актина и хемотаксис, а также нарушения этих процессов при аутоиммунных заболеваниях. Значительное внимание уделено регуляции подвижности клеток ионами кальция, принципам кальциевой сигнализации и участвующим в ней ферментам и каналам, с проведением сравнительного анализа для нейтрофилов и сперматозоидов. Обзор также охватывает существующие экспериментальные и математические модели хемотаксиса нейтрофилов и кальциевой регуляции подвижности.

Раздел «Материалы и методы» (глава 2) подробно описывает использованные в работе материалы и методики. Описаны протоколы работы с образцами спермы человека и

мыши для анализа кальциевого ответа, методы микроскопии, подготовки проточных камер. Детально изложены подходы к наблюдению хемотаксиса и кальциевой сигнализации нейтрофилов в цельной крови вокруг растущего тромба. Представлены принципы построения математических моделей кальциевого ответа в сперматозоидах, модели распределения хемоаттрактанта и движения нейтрофилов, а также модели роста ламеллиподии. Указаны методы статистической обработки данных.

В главе 3 «Результаты» представлены оригинальные данные, полученные автором в рамках диссертационного исследования. Первый раздел посвящен анализу хемотаксиса нейтрофилов вблизи растущего тромба, включая разработку методики, исследование влияния параметров потока, различных подложек, компонентов крови и роли интегринов и кальция в адгезии. Представлены результаты математического моделирования хемотаксиса. Второй раздел описывает связь хемотаксиса и кальциевой сигнализации в нейтрофилах, а также влияние скорости ветвления актина на рост ламеллиподии, подкрепленное данными по пациентам с синдромом Вискотта-Олдрича и математическим моделированием. Также в работе проводится анализ кальциевой регуляции подвижности сперматозоидов и сравнение механизмов регуляции их подвижности с лейкоцитами человека.

В главе 4 «Обсуждение результатов» (ошибочно обозначенной в оглавлении как глава 5) проводится анализ полученных данных. Обсуждается разработанная *ex vivo* модель тромбовоспаления, а также хемотаксическая природа движения нейтрофилов в этой модели, в том числе, на основании данных по пациентам с синдромом Швахмана-Даймонда. Анализируются механизмы адгезии нейтрофилов и влияние на них различных факторов. Детально рассматривается роль кальциевой сигнализации в регуляции подвижности нейтрофилов (ретракция ламеллиподий) и сравнивается с таковой у сперматозоидов (изменение направления движения). Обсуждаются результаты по росту ламеллиподий у пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича в свете данных математического моделирования.

Представленные «Выводы» четко сформулированы, полностью обоснованы экспериментальными данными и логически вытекают из содержания работы. В разделе «Практические рекомендации» автор предлагает конкретные пути использования разработанной методики. Автореферат соответствует содержанию диссертации. Основные результаты диссертации достоверны и аргументированы.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации было опубликовано 17 работ, в том числе 5 статей в международных и российских рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации результатов диссертационных исследований, из них 3 статьи в журналах первого квартиля (Q1), 4 статьи в международных системах цитирования, а также 2 статьи в иных изданиях и 10 тезисов в сборниках трудов международных научных конференций.

В целом, в работе в полной мере обоснованы все сформулированные научные положения, выводы и рекомендации. Оценивая диссертацию Коробкиной Юлии Джессики Дмитриевны как высококвалифицированное и завершенное научное исследование, задам несколько **вопросов**, на которые хотела бы получить пояснения:

1. На мой взгляд, несколько перегружены разделы, связанные с описанием активности сперматозоидов, что не относится впрямую к теме, заявленной в названии диссертации. Немного странно, что раздел описания методов начинается с описания именно этих разделов, им также уделяется большое внимание при описании результатов. Стоило, наверное, более четко заявить о сравнительном характере анализа подвижности этих клеток, демонстрирующих общебиологические механизмы кальциевой регуляции подвижности клеток различного типа и функции.
2. Мне показалось, что математические модели, использованные в работе, недостаточно подробно описаны. Я понимаю, что автор не хотела перегружать биологическую работу формулами, но дать качественное описание основных переменных, описываемых в моделях, способов описания их взаимодействия, было бы уместно и полезно. Иначе применимые модели выглядят как некий черный ящик, без четкого описания входов и выходов. При этом не очень понятно, почему сделано исключение только для модели кальциевой активации сперматозоидов, уравнения которой приведены в Приложении, хотя тоже без желательных пояснений.
3. Очень не хватало по тексту диссертации ссылок на собственные работы автора, чтобы было удобно и легко для читателя сориентироваться, в каких статьях приведены те или другие рассматриваемые результаты и ознакомиться с ними более детально.
4. Показалось также странным, что в обзоре литературы практически нет ссылок на работы коллектива, в котором выполнялась работа, в том числе, на предшествующие работы научного руководителя диссертанта.

Обращаю внимание, что высказанные замечания не влияют на высокую положительную оценку работы в целом.

Заключение

Диссертация Коробкиной Юлии Джессики Дмитриевны на тему «Подвижность нейтрофилов вблизи растущего тромба *ex vivo*» является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, содержащей решение важной научной задачи – описание характеристик подвижности нейтрофилов вблизи растущего тромба *ex vivo* и выявление механизмов регуляции их активности, – имеющей существенное значение для биофизики и медицины.

По своей актуальности, новизне, практической и теоретической значимости, методическому уровню и объему выполненных исследований работа полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Коробкина Юлия Джессика Дмитриевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Официальный оппонент

Соловьёва Ольга Эдуардовна _____

доктор физико-математических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, директор

Адрес: 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

Контактный телефон: 89122730255

Электронный адрес: o-solovey@mail.ru

Подпись д.ф-м.н. профессора Соловьёвой О.Э. заверяю:

ученый секретарь Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, к.б.н. _____ Ю.С. Храмцова

23.05.2025

В диссертационный совет 99.1.098.02

на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, Министерство науки и высшего образования Российской Федерации (109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30);

Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (117998, г. Москва, ул. Саморы Машела, д. 1)

СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по диссертации Коробкиной Юлии Джессики Дмитриевной, соискателя ученой степени кандидата биологических наук, на тему: «Подвижность нейтрофилов вблизи растущего тромба *ex vivo*» по специальности 1.5.2 – биофизика

Фамилия, Имя, Отчество (полностью)	Ученая степень, наименование отрасли науки, научных специальностей, по которым им защищена диссертация. Ученое звание (при наличии).	Полное название и адрес организации, являющейся основным местом работы официального оппонента (на момент предоставления отзыва)	Занимаемая должность в организации (на момент предоставления отзыва)	Список основных публикаций в рецензируемых научных изданиях (не менее 5-ти работ за последние 5 лет по теме оппонируемой диссертации)
Соловьёва Ольга Эдуардовна	доктор физико-математических наук (03.00.02 - биофизика), профессор	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106	директор	1. Investigation of Mechanisms of Age-Related Increase in Atrial Arrhythmia Susceptibility Using Computational Ionic Models of Atrial Cardiomyocytes. Belogurova, V., Morozova, P., Nesterova, T. & Solovyova, O., 30 сент. 2024, 2024 IEEE International Multi-Conference on Engineering, Computer and Information Sciences, SIBIRCON 2024: book. Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., стр. 231-236 6 стр. 2. Stochastic dynamics in the Li–Rinzel calcium oscillation model. Ryashko, L., Bashkirtseva, I. & Solovyova, O., 15 сент. 2022, в: Mathematical Methods in the Applied Sciences. 45, 13, стр. 7962-

				3. Mathematical modelling of the mechano-electric coupling in the human cardiomyocyte electrically connected with fibroblasts. Bazhutina, A., Balakina-Vikulova, N. A., Kursanov, A., Solovyova, O., Panfilov, A. & Katsnelson, L. B., 2021, в: Progress in Biophysics and Molecular Biology. 159, стр. 46-57 12 стр. 4. Combination of personalized computational modeling and machine learning for optimization of left ventricular pacing site in cardiac resynchronization therapy. Dokuchaev, A., Chumarnaya, T., Bazhutina, A., Khamzin, S., Lebedeva, V., Lyubimtseva, T., Zubarev, S., Lebedev, D. & Solovyova, O., 2023, в: Frontiers in Physiology. 14, 1162520. 5. Mathematical Modelling of Leptin-Induced Effects on Electrophysiological Properties of Rat Cardiomyocytes and Cardiac Arrhythmias. Nesterova, T., Rokeakh, R., Solovyova, O. & Panfilov, A., 2023, в: Mathematics. 11, 4, 874.

Выше представленные данные подтверждаю и

согласен на обработку моих персональных данных: _____ О.Э. Соловьева

(Ф.И.О. подпись официального оппонента)

24 апреля 2025 г.

Подпись официального оппонента заверяется в установленном учреждением порядке _____ Храмцова Юлия Сергеевна

(подпись, Ф.И.О. заверившего лица)

печать учреждения