УТВЕРЖДАЮ

Директор ЦТП ФХФ РАН,

_____ М.А. Пантелеев

«13» февр 2025 г.

М.П.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук

Диссертация «Подвижность нейтрофилов вблизи растущего тромба *ex vivo*» выполнена в лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН).

В период подготовки диссертации Коробкина Юлия Джессика Дмитриевна работала в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН).

В 2020 г. окончила физический факультет Московского Государственного Университета им. М. В. Ломоносова по специальности «Биохимическая физика», с 01.10.2021 проходит обучение в очной аспирантуре ЦТП ФХФ РАН по направлению подготовки 1.5 – биологические науки по специальности 1.5.2 – биофизика.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов №1/2 выдана Федеральным бюджетным учреждением науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук 16.01.2025.

Научный руководитель: Свешникова Анастасия Никитична, доктор физико-математических наук, заведующая лабораторией внутриклеточной сигнализации и системной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук.

Тема диссертационной работы и научный руководитель утверждены решением Ученого совета ЦТП ФХФ РАН №13 от 02.12.2021 г., приказ №13-УС от 03.12.2021.

По результатам рассмотрения диссертации «Подвижность нейтрофилов вблизи растущего тромба *ex vivo*» принято следующее заключение:

Оценка выполненной работы

Диссертация Коробкиной Юлии Джессики Дмитриевной является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании полученных автором результатов исследований разработаны положения, имеющие актуальное научное и практическое значение для биофизики и медицины. Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Актуальность темы

Нейтрофилы играют ключевую роль в тромбовоспалении – взаимодействии иммунной системы, эндотелия и системы свертывания крови в процессе формирования тромба. Их подвижность и распределение вблизи растущего тромба определяется целым набором явлений, включающих адгезию, хемотаксис, случайное и поток-опосредованное движение, а также взаимодействие с тромбоцитами, клетками эндотелия сосудов и межклеточным матриксом при их повреждении. Нарушения в процессе тромбовоспаления ассоциированы с патологическими состояниями, например, с онкологией, атеротромбозом и некоторыми аутоиммунными заболеваниями человека. Дефекты нейтрофилов, связанные с миграцией и нарушениями хемотаксиса, также характерны для врожденных иммунодефицитов.

Нейтрофилы рекрутируются на субстрат и взаимодействуют с ним посредством молекул адгезии, таких как селектины и интегрины. После адгезии,

для данного типа клеток характерна актин-опосредованная амебоидная подвижность. При миграции лейкоцит вступает в повторяющиеся циклы деформации. Сначала происходит рост ламеллиподии на переднем крае клетки с последующей её интегрин и селектин-опосредованной адгезией к подложке. Формирование ламеллиподии на переднем крае зависит от полимеризации и ветвления актина и малых GTP-аз. Затем происходит опосредованное актомиозиновыми волокнами сокращение тела клетки и разрыв ранее сформированных сайтов адгезии с продвижением нейтрофила вперед. При воздействии механических стимулов или распознавании хемокинов, состояние цитоскелета и интегринов регулируется целым набором вторичных мессенджеров, в том числе фосфоинозитидами и внутриклеточной концентрацией ионов кальция.

Особую значимость подвижность нейтрофилов приобретает в контексте генетических иммунодефицитов, таких как синдром Швахмана-Даймонда и синдром Вискотта-Олдрича. При данных заболеваниях подвижность нейтрофилов нарушается, что приводит к сниженной резистентности к инфекциям и повышенной склонности к воспалительным заболеваниям. Изучение механизмов регуляции подвижности нейтрофилов вблизи растущего тромба позволит глубже понять патофизиологию тромбовоспаления и предложить новые терапевтические подходы для лечения заболеваний, связанных с нарушениями миграции нейтрофилов.

Экспериментальные исследования показывают, что движение нейтрофилов в окрестности тромба определяется градиентами хемоаттрактантов, взаимодействием с тромбоцитами и плазменным звеном свертывания крови, а также активацией интегринов. Однако до сих пор не было детально изучено, каким образом эти процессы регулируют движение нейтрофилов в условиях циркулирующей крови. Настоящее исследование направлено на изучение механизмов регуляции подвижности нейтрофилов вблизи растущего тромба в условиях ex vivo.

Степень разработанности темы исследования

В существующих экспериментальных моделях движения нейтрофилов используются нейтрофилы, выделенные из цельной крови. Однако было показано, что нейтрофилы очень чувствительны к сдвиговому напряжению и

центрифугированию. В данной работе разработана экспериментальная модель хемотаксиса нейтрофилов вокруг растущего тромба в цельной крови и доказано, что данное движение является именно хемотаксисом. Работы по анализу кальциевого ответа в хемотактирующих нейтрофилах млекопитающих описаны, но только для in vitro условий.

В случае математического моделирования хемотаксиса нейтрофилов, существует целый ряд моделей, описывающих движение нейтрофилов к модельным источникам хемоаттрактантов. Однако в данной работы впервые был проведен вычислительный анализ полей хемоаттрактанта, возникающих вокруг реального растущего тромба, а также произведено математическое моделирование движения нейтрофилов в таких реалистичных полях концентрации хемоаттрактанта.

На настоящий момент существует ряд математических моделей, описывающих кальциевый ответ на прогестерон и регуляцию подвижности при помощи ионов кальция в сперматозоидах человека, однако существующие модели кальциевой активации количественно не описывают динамику концентрация кальция в сперматозоиде человека. Описанные в литературе модели регуляции подвижности сперматозоидов кальцием относятся либо к сперматозоидам беспозвоночных, либо не описывают управление кальциевым ответом на временах, соответствующих низкочастотным кальциевым осцилляциям (>100 с).

Личное участие автора в получении результатов

Личный вклад автора заключается в анализе научной литературы, разработке математических моделей кальциевой сигнализации в сперматозоидах, роста актинового цитоскелета в нейтрофиле, а также его хемотаксиса, в планировании и проведении экспериментов по микроскопии, подготовке иллюстраций, написания научных статей и тезисов по материалам работы.

Степень обоснованности и достоверности полученных результатов

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивались использованием общепринятых современных методов, таких как флуоресцентная микроскопия, статистическая обработка результатов, а также использованием распространенных методов математического моделирования и

статистической обработки данных, реализованных в общедоступных программных пакетах. Достоверность полученных результатов также подтверждается их согласованностью с известными литературными источниками.

Научная новизна

1. Разработана экспериментальная модель *ex vivo* взаимодействия нейтрофилов с растущим тромбом и показано, что движение нейтрофилов в данной постановке является хемотаксисом и подходит для его анализа у пациентов.
2. Впервые был проведен анализ состояния тромбовоспаления для пациентов с синдромом Швахмана-Даймонда. Показано, что хемотаксис для данных пациентов нарушен не только для in vitro экспериментальных постановок с использованием fMLP в качестве модельного хемоаттрактанта, но и для ex vivo модели растущего тромба.
3. Экспериментально показано, что скорость роста ламеллиподии в нейтрофилах пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича не меняется по сравнению со здоровыми контролями. 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.
4. Проведено наблюдение кальциевой сигнализации в нейтрофилах человека в ходе хемотаксиса. Показано, что кальций регулирует разборку ламеллиподий, но не их выставление при хемотаксисе нейтрофилов
5. Впервые показано, что как и в нейтрофилах человека, в сперматозоидах млекопитающих кальциевая сигнализация регулирует выбор направления движения.

Практическая значимость работы

Разработанная экспериментальная методика наблюдения взаимодействия нейтрофилов и тромбоцитов в плоскопараллельной проточной камере может быть использована для оценки хемотаксиса нейтрофилов здоровых доноров и пациентов, что позволит идентифицировать механизмы развития нарушений

функции нейтрофилов. Особенностью разработанной экспериментальной модели является использование цельной крови, что исключает влияние протоколов выделения иммунных клеток на их активность, а также позволяет исследовать взаимодействие нейтрофилов с растущим тромбом. Разработанная модель может быть использована для исследования механизмов развития иммунологических заболеваний и исследования эффектов различных вариантов терапии на функцию нейтрофилов пациентов.

Ценность научных работ соискателя, соответствие содержания диссертации специальности, полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Работа соответствует специальности 1.5.2. Биофизика на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Материалы и основные результаты диссертации достаточно полно изложены в опубликованных работах Коробкиной Юлии Джессики Дмитриевной, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, тезисы 6 докладов на российских и международных конференциях.

Апробация работы

Апробация работы проводилась на заседаниях ученого совета ЦТП ФХФ РАН. Основные результаты диссертационной работы были представлены и обсуждались на 10 всероссийских и международных конференциях: International Student Congress Of (bio)Medical Sciences (4 июня – 8 июня 2018 года, Гронинген, Нидерланды), XXVI международная конференция «Математика. Компьютер. Образование» (28 января — 2 февраля 2019, Пущино, Россия); Международная конференция “Рецепторы и внутриклеточная сигнализация” (20 мая – 24 мая 2019 года, Пущино, Россия); European Congress on Thrombosis and Haemostasis 2019 (2-4 октября 2019, Глазго, Великобритания); Четырнадцатый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, (17 июня –19 июня 2020 года, Минск, Беларусь); The 45th FEBS Virtual Congress, (3 июля — 8 июля 2021 года, Любляна, Словения); Международная конференция "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация", (22 мая – 26 мая 2023 года, Пущино, Россия); XXIV съезд физиологического общества им. П.П. Павлова, (11 сентября -- 15 сентября 2023 года, Санкт-Петербург, Россия), Российский Форум по Тромбозу и Гемостазу 2024 (14 марта –16 марта 2024 года, Москва, Россия),

ESID 2024 Immunodeficiencies Meeting (16 октября – 19 октября, 2024 года, Марсель, Франция).

Публикации по теме диссертации:

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК

1. **Korobkina, J.J.D.,** Panteleev, M.A. & Sveshnikova, A.N. Comparative Investigation of the Mechanisms of Calcium Response in Human and Murine Spermatozoa. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A* **18**, 110–126 (2024). https://doi.org/10.1134/S1990747824700132
2. **Korobkin, J.J.D.,** Deordieva, E.A., Tesakov, I.P. *et al.* Dissecting thrombus-directed chemotaxis and random movement in neutrophil near-thrombus motion in flow chambers. *BMC Biol* **22**, 115 (2024). https://doi.org/10.1186/s12915-024-01912-2
3. Morozova, D.S., Martyanov, A.A., Obydennyi, S.I., **Korobkin, J.J.D.,** *et al.* Ex vivo observation of granulocyte activity during thrombus formation. *BMC Biol* **20**, 32 (2022). https://doi.org/10.1186/s12915-022-01238-x
4. **Korobkin, J.J.D;** Balabin, F.A.; Yakovenko, S.A.; Simonenko, E.Y.; Sveshnikova, A.N. Occurrence of Calcium Oscillations in Human Spermatozoa Is Based on Spatial Signaling Enzymes Distribution. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8018. https://doi.org/10.3390/ijms22158018

Публикации в трудах конференций и съездов:

1. Медведева, В.А. Минимальная компьютерная модель кальциевого гомеостаза. / В.А. Медведева, Ю.Д. Коробкина, А.Н. Свешникова. // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация 2019, Сборник статей, место издания Типография Пятый Формат Серпухов, том 1, тезисы, С. 648-653
2. Morosova D, Towards a quantitative ex vivo assessment of the innate immune system participation in thrombus formation. / Morozova D., Martyanov A., Korobkin J., Obydennyi S., Sveshnikova A. // Abstract Book of European Congress on Thrombosis and Haemostasis, 2-4 October 2019, Glazgow, United Kingdom. Abstracts – P. 41.

3. Korobkina, J.J.D. Progesterone-induced calcium signaling in human spermatozoa / Korobkina J.J.D, Sveshnikova A.N., Simonenko E.Y., Balabin F.A. // Book of Abstracts ISCOMS 2018, Groningen, the Netherlands, P. 483

4. Коробкина, Ю.Д. Функциональное состояние циркулирующих нейтрофилов и тромбообразование в пациентах с люминальным раком молочной железы. / Коробкина Ю.Д., Адаманская Е.А., Польшина Н.И., Свешникова А.Н. / Российский Форум по Тромбозу и Гемостазу 2024 [Электронное издание]: материалы Российского Форума по Тромбозу и Гемостазу (14–16 марта 2024) / под ред. Е.В. Ройтмана — М.: ООО «Гемостаз и Реология», 2024. — С. 95.

5. Коробкина, Ю.Д. Механизмы кальциевого ответа в сперматозоидах человека и мыши / Ю.Д. Коробкина, М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова. // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 1. Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2023. – С. 139.

6. Коробкина, Ю.Д. Компьютерная модель регуляции рецепторов к инозитолтрифосфату фосфоинозитидами мембраны / Ю.Д. Коробкина, М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова. // XXIV съезд физиологического общества им. И.П. Павлова, 11–15 сентября 2023, Санкт-Петербург.: Изд-во ВВМ, 2023.– С. 343.

Диссертационная работа Коробкиной Юлии Джессики Дмитриевны. «Подвижность нейтрофилов вблизи растущего тромба *ex vivo*» удовлетворяет требованиям, установленным пп. 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в ред. Постановления Правительства РФ от 16.10.2024 №1382) и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Заключение принято на совместном расширенном заседании лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии, лаборатории физиологии и биофизики клетки, лаборатории молекулярных механизмов гемостаза, а также

лаборатории биофизики цитоскелета федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук.

Присутствовало на заседании 21 человек, в т. ч. докторов наук по рассматриваемой специальности — 5 человек.

Результаты голосования: «за» 21 чел., «против» нет, «воздержались» нет, протокол № 1 от «19» февраля 2025 г.

Председатель заседания

заведующий лабораторией физиологии и биофизики клетки
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Центра теоретических проблем
физико-химической фармакологии РАН,
д.б.н.

Елена Ивановна Синауридзе

Подпись Е.И.Синауридзе заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем
физико-химической фармакологии РАН,
к.б.н.

Кольцова Е.М.