



ЦТП ФХФ РАН, МОСКВА, РОССИЯ

9-11 Июня 2025

# Системная и биология физиология

НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ  
ДЛЯ АСПИРАНТОВ  
"СИСТЕМНАЯ  
БИОЛОГИЯ И СИСТЕМНАЯ  
ФИЗИОЛОГИЯ"

# **СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ**

## **СПЕЦИАЛЬНЫЙ ВЫПУСК**

Четвертая конференция для аспирантов  
Системная биология и системная физиология  
Москва, 9-11 июня, 2025 г.

### *Организаторы конференции:*

Федеральное государственное бюджетное учреждение Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН), г. Москва, Россия

### *Программный комитет:*

Баландина Анна Николаевна - председатель программного комитета, к.б.н., заместитель директора по науке ЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия, НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва, Москва, Россия

Пантелеев Михаил Александрович - д.ф.-м.н. профессор, член-корреспондент РАН, директор ЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия

Свешникова Анастасия Никитична - д.ф.-м.н., зав. лабораторией клеточной биологии и трансляционной медицины НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва, Москва, Россия

Атауллаханов Фазоил Иноятович - д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, ЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия

Гудимчук Никита Борисович - д.ф.-м.н., зав. лабораторией биофизики цитоскелета ЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

### *Оргкомитет:*

Овсепян Рузанна Арменовна - председатель, ЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия

### *Адрес оргкомитета:*

109029, Москва, ул. Средняя Калитниковская 30, ЦТП ФХФ РАН,  
тел.: 8 (495) 678-31-16,  
e-mail: info@ctppcr.ru

*ISSN: 2949-0758*

*DOI: 10.65189/2949-0758*

## Обращение редакции

Баландина А.А.

### Системная биология и физиология: векторы 2025 года

2025 год стал важной вехой в развитии нашего журнала «Системная биология и физиология». Официальный возраст издания превысил два года, и в системе РИНЦ был рассчитан первый полноценный импакт-фактор журнала. Полученное значение импакт-фактора (0,2), к сожалению, не отражает реального уровня цитирования публикаций журнала. По данным самой платформы eLibrary.ru, фактическое число ссылок на статьи превышает учитываемое при расчёте импакт-фактора более чем в двадцать раз. Вероятной причиной является продолжающееся цитирование неактуальной английской версии журнала, что указывает на необходимость дополнительного информирования авторов и читателей о действующей версии издания и корректных правилах цитирования. Мы рассчитываем, что на более протяжённой временной дистанции ситуация будет выравниваться, а возвращение журнала к индексированию в системе DOI позволит стандартизировать библиографические ссылки и повысить точность наукометрических показателей.

В первом выпуске текущего года журнал продолжил традицию публикации оригинальных исследований по актуальным направлениям системной биологии и физиологии. В него вошли работы, посвящённые механизмам кальциевой сигнализации в нейтрофилах [1], задачам имитации внеклеточного матрикса [2], экспериментальному моделированию онкологических заболеваний [3], мембранным реакциям свертывания крови [4], а также применению методов светорассеяния для анализа межклеточных взаимодействий [5].

Настоящий выпуск продолжает другую важную традицию журнала – публикацию тезисов одноимённой ежегодной конференции по системной биологии и физиологии, проводимой на базе ЦТП ФХФ РАН. Конференция 2025 года была ориентирована на работы аспирантов и молодых учёных и продемонстрировала высокий научный уровень представленных исследований.

Тематика докладов охватывала широкий круг вопросов, включая экспериментальные и теоретические подходы к изучению регуляции системы крови, гемостаза, тромбообразования и гемодинамики (Т. О. Шепелюк, Е. С. Бершадский, Г. А. Быков, А. Д. Мегалинский, Е. А. Мельникова, И. А. Чабин); механизмы внутриклеточной сигнализации, метаболизма и внеклеточной регуляции (А. А. Мишуков, С. В. Галкина, Е. А. Молоткова, Д. С. Прудинник); исследования цитоскелета и молекулярных машин (В. М. Демидов, Н. А. Колчин, Е. И. Николаева, А. С. Майоров, Е. В. Тарасовец); а также общие вопросы биоинформатики, теоретической и математической биологии (Л. С. Ведерников, Т. И. Кадыров, А. А. Воронин).

Редакция журнала поздравляет участников конференции с представленными сильными и содержательными работами и желает молодым исследователям дальнейших научных успехов и побед на конкурсах молодых учёных в предстоящем году.

### Литература

- [1] A. E. Boldova, D. Yu. Nechipurenko, M. A. Panteleev, A. N. Sveshnikova, "Determining the role of cytoskeletal reorganization in clustering of platelet receptors (GPVI) to collagen using agent-based modeling," SBP, vol. 4, no. 1, pp. 3–15, Jun. 2025, doi: 10.65189/2949-0758-2025-4-1-3-15.
- [2] L. S. Vedernikov, S. V. Galkina, A. N. Sveshnikova, "Limitations of the application of the method of estimating the highest Lyapunov exponent for assessing the complexity of calcium oscillations," SBP, vol. 4, no. 1, pp. 16–21, Jun. 2025, doi: 10.65189/2949-0758-2025-4-1-16-21.
- [3] T. I. Kadyrov, "Ultrasensitivity and thresholds in cascades of kinases and proteases," SBP, vol. 4, no. 1, pp. 22–29, Jun. 2025, doi: 10.65189/2949-0758-2025-4-1-22-29.
- [4] N. S. Emelianov, "Mathematical models of Protein-Kinase C activation: current status and future prospects," SBP, vol. 4, no. 1, pp. 30–34, Jun. 2025, doi: 10.65189/2949-0758-2025-4-1-30-34.
- [5] T. A. Kovalenko, "Mathematical modeling in solving complex biophysical problems," SBP, vol. 4, no. 1, pp. 35–37, Jun. 2025, doi: 10.65189/2949-0758-2025-4-1-35-37.

# **Анализ окклюзивной динамики роста тромба в микрофлюидной системе *in vitro*.**

## ***Analysis of the occlusive dynamics of thrombus growth in the microfluidic system *in vitro*.***

Шепелюк Т.О.<sup>1</sup>  
Shepelyuk T.O.<sup>1</sup>

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, ул. Средняя Калитниковская 30, Москва, Россия, 109029
1. Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Получено: 29.05.2025

Принято к публикации: 30.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: DRDSJT

### **Введение**

Неконтролируемый рост тромба может привести к окклюзии сосуда и инфаркту органов. Хотя структура зрелых окклюзивных тромбов хорошо охарактеризована, динамические процессы, управляющие формированием окклюзивного тромба и позволяющие ему преодолеть влияние потока, остаются недостаточно изученными.

### **Материалы и методы**

Мы разработали микрофлюидную систему для визуализации 3D-роста тромба *in vitro*. Цельную кровь здоровых доноров пропускали через канал шириной 100 мкм при  $1000 \text{ с}^{-1}$ , имитируя условия в артериолах. Повреждение имитировали полоской шириной 50 мкм, покрытой коллагеном и тканевым фактором.

### **Результаты**

Адгезия тромбоцитов начиналась на полоске через  $19.9 \pm 6.3 \text{ с}$  ( $N=5$ ) и дальнейшая агрегация происходила быстрее у стенок канала. Через  $4.9 \pm 0.7$  мин появлялся фибрин на уровне до 4 мкм, распространявшийся за пределы границы тромба. На уровне полоски тромб ограничивался ее размерами, формируя опорную часть тромба, однако в верхних слоях агрегация тромбоцитов выходила за пределы зоны активации. Перед полоской тромбоциты агрегировали у стенок, распространяясь до 50 мкм. За полоской агрегация шла быстрее, образуя длинный "хвост" с максимальной высотой в центре канала, почти в 4 раза длиннее полоски. По центру полоски сохранялась "выемка", постепенно уменьшающаяся по мере агрегации тромбоцитов и слияния и деформации агрегатов под действием потока. Контракция тромба (по кимограммам) была наиболее выражена в области "хвоста" и там же происходила окклюзия в  $16.5 \pm 1.5$  мин. Сканирующая электронная микроскопия показала последовательное изменение формы тромбоцитов: от образования филоподий до плотной упаковки. Окклюзивный тромб характеризовался плотно упакованными тромбоцитами, фибриновой сетью с захваченными эритроцитами, отражающее высокую степень активации тромбоцитов.

### **Выводы**

Окклюзия *in vitro* обусловлена неконтролируемым ростом тромба вниз по потоку и, вероятно, такая форма тромба определяется воздействием скорости сдвига и распространением тромбина.

### **Благодарности**

Д.б.н., академик РАН Атауллаханов Ф.И.

## **Introduction**

Uncontrolled blood clot growth can lead to vessel occlusion and organ infarction. Although the structure of mature occlusive thrombi is well characterized, the dynamic processes governing the formation of an occlusive thrombus and allowing it to overcome the influence of flow remain poorly understood.

## **Materials and methods**

We have developed a microfluidic system for visualizing 3D blood clot growth in vitro. Whole blood from healthy donors was passed through a channel 100 microns wide at  $1000 \text{ s}^{-1}$ , simulating the conditions in the arterioles. The damage was simulated with a 50-micron-wide strip coated with collagen and tissue factor.

## **Results**

Platelet adhesion began on the strip after  $19.9 \pm 6.3 \text{ s}$  ( $N=5$ ) and further aggregation occurred faster at the canal walls. After  $4.9 \pm 0.7 \text{ min}$ , fibrin appeared at a level of up to 4 microns, spreading beyond the boundary of the thrombus. At the strip level, the thrombus was limited by its size, forming the supporting part of the thrombus, however, in the upper layers, platelet aggregation went beyond the activation zone. Before the strip, platelets aggregated against the walls, spreading up to 50 microns. Aggregation followed the strip faster, forming a long "tail" with a maximum height in the center of the channel, almost 4 times longer than the strip. A "notch" remained in the center of the strip, gradually decreasing as platelets aggregated and aggregates merged and deformed under the influence of the flow. Thrombus contraction (according to kilmograms) was most pronounced in the "tail" area and occlusion occurred there at  $16.5 \pm 1.5 \text{ min}$ . Scanning electron microscopy showed a consistent change in the shape of platelets: from the formation of filopodia to dense packing. The occlusive thrombus was characterized by densely packed platelets, a fibrin network with trapped red blood cells, reflecting a high degree of platelet activation.

## **Conclusions**

In vitro occlusion is caused by the uncontrolled growth of a blood clot downstream, and this shape of the blood clot is probably determined by the effect of shear velocity and the spread of thrombin.

## **Acknowledgements**

PhD, Academician of the Russian Academy of Sciences Ataullakhanov F.I.

# Кластеризация CENP-T обеспечивает эффективную сборку компонентов внешнего кинетохора, необходимую для прочного связывания с микротрубочками

## Clustering of CENP-T ensures efficient assembly of outer kinetochore required for stable microtubule binding

Тарасовец Е. В.<sup>1</sup>

Tarasovets E.V.<sup>1</sup>

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, ул. Средняя Калитниковская 30, Москва, Россия, 109029

1. Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Получено: 30.05.2025

Принято к публикации: 31.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: IZCEZG

### Введение

Сборка функционального кинетохора требует упорядоченного и локализованного связывания различных белков. Каркасный белок CENP-T рекрутирует две молекулы комплекса Ndc80, необходимого для взаимодействия с микротрубочками веретена деления. Однако в цитоплазме отдельные молекулы CENP-T не связываются с Ndc80, что подчёркивает важность центральной локализации. Мы предположили, что кластеризация молекул CENP-T в области центромеры играет ключевую роль в рекрутировании Ndc80.

### Материалы и методы

Для проверки этой гипотезы мы создали искусственные кластеры, состоящие из 60 копий CENP-T, чтобы изучить их взаимодействие с другими кинетохорными белками в клетках. Кроме того, мы исследовали взаимодействие CENP-T с Ndc80 *in vitro*, используя рекомбинантные белки и TIRF-флуоресцентный анализ в реальном времени, отслеживая взаимодействия GFP-меченного Ndc80 с CENP-T как в кластерной, так и в мономерной формах.

### Результаты

В клетках кластеризованный CENP-T, в отличие от мономерного, эффективно рекрутировал Ndc80 и другие белки, формируя структуры, сходные по составу с полноценными кинетохорами. Эти комплексы связывались с микротрубочками и двигались процессивно, следуя за их динамическими концами — поведение, характерное для нативных кинетохоров. Различия между мономерной и кластеризованной формами CENP-T объясняются *in vitro* результатами: обе формы связывают по два комплекса Ndc80, однако диссоциация происходит значительно быстрее от мономерного CENP-T. Кроме того, стабильность взаимодействия возрастает со временем, что указывает на процесс «созревания» сайтов связывания, происходящий значительно быстрее у кластеризованной формы.

### Выводы

Плотностезависимая активация созревания сайтов CENP-T для рекрутирования Ndc80 может представлять собой ключевой механизм регуляции сборки кинетохора. Этот механизм ограничивает взаимодействия между компонентами в цитоплазме митотических клеток, но усиливает их на кинетохоре, где высокая локальная плотность обеспечивает эффективное и стабильное связывание Ndc80, необходимое для точной сегрегации хромосом.

### Благодарности

Д.б.н., академик РАН Атауллаханов Ф.И.

## **Introduction**

The assembly of a functional kinetochore requires the ordered and localized recruitment of various proteins. The scaffold protein CENP-T recruits two Ndc80 complexes, which are essential for interacting with spindle microtubules. However, in the cytoplasm, individual CENP-T molecules do not bind Ndc80, highlighting the importance of centromeric localization. We hypothesized that clustering of CENP-T molecules at the centromere plays a key role in Ndc80 recruitment.

## **Materials and methods**

To test this hypothesis, we created artificial clusters containing 60 copies of CENP-T to study their interaction with other kinetochore proteins in cells. Additionally, we examined the interaction between CENP-T and Ndc80 in vitro using recombinant proteins and real-time TIRF fluorescence microscopy, tracking the interaction of GFP-tagged Ndc80 with CENP-T in both clustered and monomeric forms.

## **Results**

In cells, clustered CENP-T, in contrast to the monomeric form, efficiently recruited Ndc80 and other proteins, forming structures similar in composition to fully assembled kinetochores. These complexes bound microtubules and moved processively, tracking the dynamic microtubule ends, behavior characteristic of native kinetochores. The differences between the monomeric and clustered forms of CENP-T are consistent with in vitro results: both forms of CENP-T bind two Ndc80 complexes, but dissociation occurs significantly faster from the monomeric form. Furthermore, the interaction becomes increasingly stable over time, suggesting a maturation process of the binding sites that proceeds more rapidly in the clustered form.

## **Conclusions**

Density-dependent activation of CENP-T site maturation for Ndc80 recruitment may represent a key regulatory mechanism in kinetochore assembly. This mechanism restricts interactions between components in the cytoplasm of mitotic cells but enhances them at the kinetochore, where high local density ensures efficient and stable Ndc80 binding necessary for accurate chromosome segregation.

## **Acknowledgements**

PhD, Academician of the Russian Academy of Sciences Ataullakhanov F.I.

# Молекулярные механизмы рекрутирования Ndc80 кластеризованным CENP-T

## Molecular mechanisms of Ndc80 recruitment by clustered CENP-T

Майоров А. С.<sup>1</sup>, Тарасовец Е. В.<sup>1</sup>  
Mayorov A. S.<sup>1</sup>, Tarasovets E. V.<sup>1</sup>

1. Университет Пенсильвании, Филадельфия, США  
1. University of Pennsylvania, Philadelphia, USA

Получено: 01.06.2025

Принято к публикации: 03.06.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: XVLEYZ

### Введение

Сборка функционального кинетохора требует точной пространственной и временной координации связывания белков, включая CENP-T и комплекс Ndc80. Кластеризация CENP-T в области центромеры обеспечивает специфичную локализацию компонентов внешнего кинетохора. В отличие от растворимого CENP-T, кластеризованный CENP-T эффективно рекрутирует Ndc80, что подчеркивает значимость пространственной организации белка. Тем не менее, молекулярные механизмы и кинетика этого процесса остаются недостаточно изученными.

### Материалы и методы

Для изучения кинетики взаимодействия CENP-T и Ndc80 использовались рекомбинантные 60-мерные частицы с ковалентно связанными фрагментами CENP-T, мечеными GFP. Ассоциация и диссоциация комплекса Ndc80 наблюдалась методом TIRF-микроскопии. Структурное моделирование сайтов связывания проводилось с использованием AlphaFold.

### Результаты

Связывание Ndc80 с CENP-T происходило в два этапа: быстрая начальная ассоциация и последующее созревание комплекса. Сайт 2 демонстрировал в 15 раз более быструю зрелость, чем сайт 1. Мутационные замены центральной спирали и фланкирующих участков подтвердили, что ни одна структура по отдельности не определяет кинетику — решающей является их комбинация.

### Выводы

Мы предполагаем, что ускоренное и устойчивое связывание комплекса Ndc80 является внутренним свойством кластеризованного CENP-T и определяется совокупной архитектурой его сайтов связывания — центральных  $\alpha$ -спиралей и фланкирующих участков. Такая организация способствует специфичной сборке наружного кинетохора в области центромеры и предотвращает неспецифичные взаимодействия в цитоплазме.

### Благодарности

Екатерина Леонидовна Грищук Ph D, Фазиол Инноятович Атауллаханов д.б.н.

## **Introduction**

The assembly of a functional kinetochore requires precise spatial and temporal coordination of protein binding, including CENP-T and the Ndc80 complex. CENP-T clustering in the area of the centromere provides a specific localization of the components of the external kinetochore. Unlike soluble CENP-T, clustered CENP-T efficiently recruits Ndc80, which highlights the importance of the spatial organization of the protein. Nevertheless, the molecular mechanisms and kinetics of this process remain poorly understood.

## **Materials and methods**

To study the kinetics of the interaction of CENP-T and Ndc80, recombinant 60-dimensional particles with covalently bound CENP-T fragments labeled with GFP were used. Association and dissociation of the Ndc80 complex were observed by TIRF microscopy. Structural modeling of binding sites was carried out using AlphaFold.

## **Results**

The binding of Ndc80 to CENP-T occurred in two stages: rapid initial association and subsequent maturation of the complex. Site 2 demonstrated 15 times faster maturity than site 1. Mutational substitutions of the central helix and flanking regions confirmed that no single structure individually determines the kinetics — their combination is crucial.

## **Conclusions**

We assume that accelerated and stable binding of the Ndc80 complex is an intrinsic property of clustered CENP-T and is determined by the combined architecture of its binding sites — central alpha helices and flanking regions. This organization promotes the specific assembly of the external kinetochore in the centromere region and prevents non-specific interactions in the cytoplasm.

## **Acknowledgements**

Ekaterina Leonidovna Grischuk Ph.D., Fazoil Innoyatovich Ataulakhanov PhD.

# **Модели движения кинетохорного комплекса Ndc80c по микротрубочкам под действием приложенной силы**

## **Models of Ndc80c kinetochore complex translocation along microtubules under external load**

Гончар И.В.<sup>1</sup>

Gonchar I.V.<sup>1</sup>

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, г. Москва, Россия

1. Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Moscow, Russia

Получено: 30.05.2025

Принято к публикации: 31.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: USWJQL

### **Введение**

Комплекс кинетохорных белков Ndc80c связывает митотические хромосомы с микротрубочками веретена деления. При делении клетки Ndc80c испытывает переменные по направлению нагрузки, двигаясь асимметрично вдоль микротрубочек с разной скоростью. Сейчас отсутствует количественная модель механизма, обуславливающего различное сопротивление скольжению в зависимости от его направления.

### **Материалы и методы**

Зависимости скорости скольжения от приложенной к Ndc80c силы описывались феноменологическими моделями беллового типа и аналитическими моделями для различных профилей потенциалов взаимодействия Ndc80c и микротрубочек, а также моделями броуновской динамики, описывающими односайтовое связывание Ndc80c или двухсайтовое взаимодействие Ndc80c с отдельными вкладами Ndc1 и Nuf2 доменов. Результаты численного моделирования сравнивались с экспериментальными данными, полученными методом сверхбыстрой силовой спектроскопии (UFFC) и обработанных с привлечением его детальной механической модели, для конструктора Ndc80c Bonsai и двух его мутантов, в которых был изменён Ndc1 или Nuf2 домен.

### **Результаты**

Односайтовые модели с симметричными и асимметричными потенциалами, как и простейшие модели беллового типа, не способны описать наблюдаемую асимметрию скольжения Ndc80c, однако двухсайтовая модель показала хорошее согласие с экспериментальными данными для конструктора Ndc80c Bonsai с характерными энергиями связывания 6 кВТ для Ndc1 и Nuf2 доменов. Также эта модель описала скольжение мутантов Ndc80c Bonsai с изменёнными Ndc1 или Nuf2 доменами за счёт уменьшения энергии связывания модифицированных доменов на 2 кВТ и 1 кВТ соответственно. При этом в модели показано постепенное вовлечение Nuf2 домена во взаимодействие с микротрубочкой с ростом силы, прижимающей Ndc80c к ней.

### **Выводы**

Двухсайтовая модель взаимодействия Ndc80c с микротрубочкой показывает значимость вклада домена Nuf2 в их взаимодействии и позволяет количественно описать асимметрию их относительного движения в зависимости от его направления.

### **Благодарности**

д. б. н., проф., академик РАН Атауллаханов Фазоил Иноятович

## **Introduction**

Ndc80c is a complex of kinetochore proteins that connects chromosomes to the microtubules of a mitotic spindle. During cell division, Ndc80c experiences changes in load direction and magnitude, resulting in asymmetric gliding along the microtubule wall. Currently, there is no quantitative model for the mechanism that governs this direction-dependent resistance to Ndc80c gliding.

## **Materials and methods**

The relationship between gliding velocity and the force applied to the Ndc80c molecule was analyzed using a phenomenological Bell-like model, as well as explicit analytical formulas for various potential well profiles that define the Ndc80c interaction with the microtubule. Additionally, Brownian dynamics simulations were conducted to describe single- and two-site Ndc80c-microtubule interactions, considering the separate contributions of the Hec1 and Nuf2 subunits. Numerical computations were compared with experimental data previously obtained through ultra-fast force clamp spectroscopy for the Ndc80c Bonsai construct and its two modifications, which involved alterations to either the Hec1 or Nuf2 subunits.

## **Results**

Single-site analytical and Brownian models using symmetric and asymmetric potential wells, as well as Bell-like model were unable to quantitatively and qualitatively recapitulate experimentally observed directional asymmetry of Ndc80c gliding. However, the two-site model showed good agreement with experiment involving the Ndc80c Bonsai construct with binding energies of 6 kBT for both Hec1 and Nuf2 subunits. Furthermore, this model described gliding of Ndc80c mutants showing reduction of binding energy by 2 kBT for the Hec1 mutant and 1 kBT for the Nuf2 mutant respectively. Notably, the model revealed gradual engagement of the Nuf2 subunit into Ndc80c-microtubule interaction as the force increased, bending Ndc80c toward the microtubule wall.

## **Conclusions**

Two-site model of Ndc80c-microtubule interaction demonstrated a substantial contribution of the Nuf2 subunit in force-dependent gliding resistance and is capable of quantitative describe direction-dependent asymmetry in the force-velocity relationship.

## **Acknowledgements**

Fazoil Inoyatovich Ataullakhanov, D.Sc., Prof., Academician of RAS

# Нетипичное скольжение кинетохорного белка Ndc80 вдоль микротрубочки под действием внешней силы

## *Atypical sliding of the kinetochore protein Ndc80 along a microtubule under the action of an external force*

Демидов В.М.<sup>1</sup>

Demidov V.M.<sup>1</sup>

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, г. Москва, Россия

1. Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Moscow, Russia

Получено: 31.05.2025

Принято к публикации: 02.06.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: NJYMFS

### Введение

Во время деления клетки, кинетохорные белки, ассоциирующиеся с микротрубочками, поддерживают подвижные связи со стенками микротрубочек веретена деления под действием сил, изменяющихся как по величине, так и по направлению. Ключевым компонентом этого «подвижного клея» является белковый комплекс Ndc80, который *in vitro* демонстрирует броуновское движение вдоль микротрубочек. Однако механизм, с помощью которого Ndc80 скользит вдоль микротрубочки под действием внешней силы, остаётся неясным.

### Материалы и методы

Мы закрепили микротрубочку с двух сторон за микросферы, захваченные в оптические ловушки, чтобы осциллировать микротрубочкой рядом с поверхностью «пьедестальной» микросферы, покрытой человеческим белком Ndc80. В режиме сверхбыстрой силовой спектроскопии мы зафиксировали события движения единичных молекул при постоянных силах в диапазоне от 2 до 15 пН. Движение нескольких молекул Ndc80 было изучено с помощью режима постоянной скорости.

### Результаты

Наши результаты показывают, что Ndc80 перемещается с разной скоростью в зависимости от направления приложенной силы. В частности, когда Ndc80 тянут в сторону плюс-конца микротрубочки, его скорость оказывается ниже, чем предсказано из коэффициента диффузии в отсутствие силы. Таким образом сила, направленная в сторону плюс-конца усиливает взаимодействие белка с микротрубочкой. Когда несколько молекул Ndc80 скользят вместе в режиме постоянной скорости, их движение представляет собой чередование участков почти постоянной скорости и кратковременных проскальзываний. Такой характер движения отклоняется от предсказаний, основанных на классической диффузии, и, по-видимому, возникает из-за влияния внешней силы на силу взаимодействия Ndc80 с микротрубочкой.

### Выводы

Наблюдаемое ограничение скорости в ансамблях скользящих молекул Ndc80 может представлять собой молекулярную основу «регулятора», контролирующего скорость движения кинетохор в митозе.

### Благодарности

д. б. н., проф., академик РАН Атауллаханов Фазоил Иноятович

## **Introduction**

During cell division, microtubule-associated kinetochore proteins maintain mobile bonds with walls of the mitotic spindle microtubules under external forces varying both in magnitude and direction. The key component of this “mobile glue” is the Ndc80 protein complex, which in vitro demonstrates Brownian motion along microtubules. However, the mechanism by which Ndc80 translocates along the microtubule wall under an external force remains unclear.

## **Materials and methods**

We attached a microtubule to trapped microspheres on both sides using optical traps in order to oscillate the microtubule near the surface of an immobilized “pedestal” microsphere coated with human Ndc80 protein. Using ultrafast force spectroscopy technique, we recorded the interaction events of single molecules at constant forces in the range from 2 to 15 pN. The motion of several Ndc80 molecules was studied using a constant velocity assay.

## **Results**

Our results show that the Ndc80 protein translocates at different velocities depending on the direction of the applied force. In particular, when Ndc80 is pulled towards the plus end of the microtubule, its velocity is lower than predicted from the coefficient of force-free diffusion. Thus, the force directed towards the plus end enhances the interaction of the protein with the microtubule, causing increased frictional resistance. When several Ndc80 molecules slide together in a constant velocity assay, their movement is an alternation of nearly constant limited-velocity segments and short-term slippages. This pattern of motion deviates from the predictions based on classical diffusion and appears to arise from the influence of an external force on the strength of the interaction of Ndc80 with the microtubule.

## **Conclusions**

The observed velocity limitation in ensembles of sliding Ndc80 molecules may represent the molecular basis of a friction “regulator” that controls the velocity of kinetochores in mitosis.

## **Acknowledgements**

PhD, Prof., Academician of the Russian Academy of Sciences, F.I. Atullakhanov.

# **Пациенты с наследственными гемолитическими анемиями имеют повышенный уровень циркулирующих фосфатидилсерин-экспрессирующих эритроцитов**

## ***Patients with hereditary hemolytic anemia have elevated levels of circulating phosphatidylserine-expressing red blood cells***

Чабин И.А.<sup>1</sup>  
Chabin I.A.<sup>1</sup>

1. ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава РФ  
1. Dmitry Rogachev National Medical Research Center Of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology

Получено: 31.05.2025

Принято к публикации: 02.06.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: TBONKG

### **Введение**

Для пациентов с наследственными гемолитическими анемиями характерен повышенный риск развития венозных тромбозов и тромбоэмболических осложнений. Механизмы, лежащие в основе этих осложнений, до конца не ясны, но предполагается роль повреждения эндотелия и эритроцитопосредованной активации тромбоцитов. Считается, что в крови таких пациентов могут существовать эритроциты, поддерживающие мембранно-зависимые реакции свертывания за счет экспрессии фосфатидилсерина (ФС). В данной работе представлены результаты цитофлуориметрической оценки эритроцитов цельной крови у пациентов с наследственными гемолитическими анемиями.

### **Материалы и методы**

Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Оценка экспрессии ФС проводилась посредством окрашивания разведенной цельной крови аннексином V-AF647 (100 нМ) и С2-фрагментом лактадхерина с рекомбинантной меткой mNeonGreen (100 нМ), эритроциты выделялись исходя из показателей светорассеяния или окрашиванием антителами к гликофору А. В анализ было включено 20 пациентов с наследственным сфероцитозом, 11 пациентов с дефицитом пируваткиназы эритроцитов и 24 здоровых донора. Статистическая обработка проводилась с использованием дисперсионного анализа ANOVA с пост-хок тестом Холма-Бонферрони, выпадающие точки исключались из анализа.

### **Результаты**

При оценке ФС-положительных эритроцитов с помощью лактадхерина в крови пациентов с наследственным сфероцитозом и дефицитом пируваткиназы, выявлено достоверное увеличение процента ФС+ эритроцитов:  $0.26556 \pm 0.02522\%$  и  $0.465 \pm 0.07208\%$  соответственно (среднее  $\pm$  стандартная ошибка) в сравнении с  $0.13038 \pm 0.01424\%$  для группы здоровых добровольцев. Аналогичные результаты, но с меньшими абсолютными значениями получены для аннексина V, однако, связывание аннексина V достоверно не детектировалось в отсутствие антиэритроцитарных антител.

### **Выводы**

При наследственных гемолитических анемиях, например, наследственном сфероцитозе и дефиците пируваткиназы, в крови обнаруживается повышенный уровень циркулирующих эритроцитов, экспрессирующих фосфатидилсерин на внешней мембране, т.е. являющихся прокоагулянтными. Данный феномен может объяснять повышенные риски тромбообразования у данных пациентов.

### **Благодарности**

к.б.н. Подоплелова Н.А., д.ф.-м.н., профессор, член-корр. РАН Пантелеев М.А.

## **Introduction**

Patients with hereditary hemolytic anemia are characterized by an increased risk of venous thrombosis and thromboembolic complications. The mechanisms underlying these complications are not fully understood, but the role of endothelial damage and erythrocyte-mediated platelet activation is assumed. It is believed that red blood cells may exist in the blood of such patients that support membrane-dependent coagulation reactions due to the expression of phosphatidylserine (PS). This paper presents the results of cytofluorimetric evaluation of whole blood erythrocytes in patients with hereditary hemolytic anemia.

## **Materials and methods**

This study was approved by the local Ethics committee of the National Research Medical Center named after Dmitry Rogachev. PS expression was evaluated by staining diluted whole blood with annexin V-AF647 (100 nM) and a C2 fragment of lactadherin with the recombinant label mNeonGreen (100 nM), red blood cells were isolated based on light scattering or staining with antibodies to glycophorin A. The analysis included 20 patients with hereditary spherocytosis, 11 patients with erythrocyte pyruvate kinase deficiency, and 24 healthy donors. Statistical processing was performed using ANOVA analysis of variance with the Holm-Bonferroni post-hoc test, and the missing points were excluded from the analysis.

## **Results**

When evaluating PS-positive erythrocytes using lactadherin in the blood of patients with hereditary spherocytosis and pyruvate kinase deficiency, a significant increase in the percentage of PS<sup>+</sup> erythrocytes was revealed:  $0.26556 \pm 0.02522\%$  and  $0.465 \pm 0.07208\%$ , respectively (mean  $\pm$  standard error) compared with  $0.13038 \pm 0.01424\%$  for the group of healthy volunteers. Similar results, but with lower absolute values, were obtained for annexin V, however, the binding of annexin V was not reliably detected in the absence of anti-CD235a antibodies.

## **Conclusions**

In hereditary hemolytic anemia, for example, hereditary spherocytosis and pyruvate kinase deficiency, an increased level of circulating red blood cells expressing phosphatidylserine on the outer membrane, i.e., being procoagulant, is found in the blood. This phenomenon may explain the increased risk of thrombosis in these patients.

## **Acknowledgements**

PhD Podoplelova N.A., PhD, Professor, Corresponding member. RAS Panteleev M.A.

# **Термостабильность мутантной формы эритроцитарной пируваткиназы (R510Q) при физиологических условиях**

## **Thermostability of a mutant form of erythrocyte pyruvate kinase (R510Q) under physiological conditions**

Прудинник Д.С.<sup>1,2</sup>, Долгих И.А.<sup>1</sup>, Протасов Е.С.<sup>1,2</sup>, Колева Л.<sup>1,2</sup>, Синауридзе Е.И.<sup>1,2</sup>, Ф. И. Атауллаханов<sup>2,3</sup>

Prudinnik D.S.<sup>1,2</sup>, Dolgikh I.A.<sup>1</sup>, Protasov E.S.<sup>1,2</sup>, Koleva L.<sup>1,2</sup>, Sinauridze E.I.<sup>1,2</sup>, F.I. Ataulakhanov<sup>2,3</sup>

1. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

2. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

3. Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA

1. Dmitry Rogachev National Medical Research Center for Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Moscow, Russia

2. Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

3. Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA

Получено: 31.05.2025

Принято к публикации: 02.06.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: DWYNJW

### **Введение**

Для исследования были отобраны 4 пациента с мутантной формой гликолитического фермента, эритроцитарной пируваткиназы (ПК) R510Q. Данная форма является самой распространенной среди тех, что приводят к несфероцитарной гемолитической анемии, дефициту ПК. Известно, что форма R510Q имеет низкую стабильность. Проблема заключается в том, что стандарт определения стабильности гликолитического фермента предполагает оценку его температурной стабильности (термостабильности) при 53°C, а стабилизатор ПК, фруктозо-1,6-дифосфат (ФДФ), либо отсутствует, либо присутствует в насыщающих концентрациях. Таким образом, стандартный подход к определению стабильности ПК не позволяет оценить реальное время жизни фермента в физиологических условиях и глубже разобраться в механизмах, лежащих в основе дефицита ПК.

### **Материалы и методы**

Гемолизат пациентов был очищен от ФДФ с помощью ультрацентрифугирования с отсечением 10 кДа. Термостабильность фермента оценивали, измеряя активность ПК как функцию времени инкубации гемолизата пациента. Также термостабильность фермента оценивалась как функция от температуры инкубации и концентрации стабилизатора.

### **Результаты**

Было показано, что в диапазоне от 53°C до 45°C реакция деактивации фермента подчиняется закону Аррениуса. Полученные данные позволяют предположить, что  $t_{1/2}$  эритроцитарной ПК R510Q в физиологических условиях составляет от нескольких часов до 13 суток в зависимости от концентрации ФДФ. Как при физиологической концентрации ФДФ, так и при повышенной в несколько раз, время функциональной активности ПК составит всего несколько суток, соответственно, эритроцит проживет сопоставимый срок. Литературные данные, однако, говорят о том, что эритроциты пациентов с мутантной формой R510Q живут в разы дольше.

### **Выводы**

Таким образом, оказалось, что для объяснения такого длительного времени циркуляции эритроцитов в кровотоке учет стабилизации фермента посредством ФДФ не является исчерпывающим и требуется проведение дальнейших исследований.

### **Благодарности**

Долгих И.А.; к.ф.-м.н. Протасов Е.С.; к.б.н. Колева Л.; д.б.н. Синауридзе Е.И. (заведующая лабораторией); академик РАН, д.б.н., профессор Ф. И. Атауллаханов (научный руководитель)

## **Introduction**

Four patients with a mutant form of the glycolytic enzyme, erythrocyte pyruvate kinase (PK) R510Q, were selected for the study. This form is the most common among those leading to nonspherocytic hemolytic anemia called PK deficiency. The R510Q form is known to have low stability. The problem is that the standard for determining the stability of a glycolytic enzyme involves assessing its temperature stability (thermostability) at 53°C, and the PK stabilizer, fructose-1,6-diphosphate (FDP), is either absent or present in saturating concentrations. Thus, the standard approach to determining PK stability does not allow us to assess the actual lifetime of the enzyme under physiologic conditions and to further understand the mechanisms underlying PK deficiency.

## **Materials and methods**

The hemolysate of patients was purified from FDP by ultracentrifugation with a 10 kDa cutoff. The thermostability of the enzyme was assessed by measuring PK activity as a function of the incubation time of the patient's hemolysate. The thermostability of the enzyme was also evaluated as a function of incubation temperature and stabilizer concentration.

## **Results**

It was shown that in the range from 53°C to 45°C the enzyme deactivation reaction obeys the Arrhenius law. The data obtained suggest that the  $t_{1/2}$  of erythrocyte PK R510Q under physiological conditions ranges from several hours to 13 days depending on the concentration of FDP. Both at physiologic concentration of FDP and at several times higher concentration of FDP, the time of functional activity of PK will be only a few days, accordingly, the erythrocyte will live for a comparable period of time. Literature data, however, suggest that erythrocytes from patients with the R510Q mutant form live many times longer.

## **Conclusions**

Thus, it appeared that to explain such a long circulation time of erythrocytes in the bloodstream, the account of FDP enzyme stabilization is not exhaustive and further studies are required.

## **Acknowledgements**

I.A. Dolgikh; E.S. Protasov, Ph.D.; L. Koleva, Ph.D., E.I. Sinauridze, Ph.D. (head of the laboratory); F.I. Ataullakhanov, Ph.D. (scientific supervisor).

# Мутация p.E250K в белке PSTPIP1 приводит к снижению его экспрессии и нарушает формирование подосом в макрофагах

## The p.E250K mutation in the PSTPIP1 protein leads to a decrease in its expression and disrupts the formation of podosomes in macrophages

Колчин Н.А.<sup>1,2</sup>

Kolchin N.A.<sup>1,2</sup>

1. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия
2. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия
1. Dmitry Rogachev National Medical Research Center for Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Moscow, Russia
2. Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Получено: 29.05.2025

Принято к публикации: 30.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: EOZFCN

### Введение

Патогенные генетические варианты PSTPIP1 (Proline-Serine-Threonine Phosphatase Interacting Protein 1) связаны с группой аутовоспалительных заболеваний, объединенных под названием PAID. Белок PSTPIP1 содержит функциональные домены F-BAR и SH3 и участвует в регуляции актинового цитоскелета, а также в активации воспалительных сигнальных путей через белок пирин. Ранее было показано, что патогенные варианты PSTPIP1 могут нарушать образование подосом в макрофагах. В данной работе мы изучили функциональное влияние варианта p.E250K PSTPIP1 в макрофагах, полученных из первичных клеток. Целью работы был анализ уровня белка PSTPIP1 и характеристика кинетики образования подосом в первичных макрофагах, полученных от пяти пациентов с вариантом E250K.

### Материалы и методы

Уровень белка PSTPIP1 измеряли с помощью вестерн-блоттинга. Характеристики подосом оценивали методом конфокальной микроскопии в фиксированных клетках. Для визуализации динамики подосом в живых клетках использовали макрофаги, трансфицированные мРНК LifeAct-mStayGold.

### Результаты

В макрофагах пациентов с вариантом E250K уровень белка PSTPIP1 был значительно снижен по сравнению с контролем. У пациентов наблюдалось заметное уменьшение среднего количества подосом на клетку по сравнению с контрольной группой. Кроме того, доля клеток, лишенных подосом, была значительно выше в макрофагах с E250K. Однако визуализация в режиме реального времени показала, что, несмотря на снижение среднего количества подосом, вариант E250K значительно повышает их стабильность.

### Выводы

Наше исследование впервые демонстрирует, что мутация E250K в F-BAR домене PSTPIP1 может оказывать двойное влияние на первичные макрофаги. С одной стороны, мутация снижает количество клеток, формирующих подосомы, а с другой — увеличивает их стабильность. Кроме того, вариант E250K негативно влияет на уровень белка PSTPIP1 в макрофагах. Эти результаты раскрывают ранее неизвестную роль PSTPIP1 в регуляции динамики подосом и предоставляют новые данные о молекулярных механизмах, лежащих в основе патогенеза PAID.

### Благодарности

Бутову К. Р. (научный руководитель). Благотворительному фонду “Наука-детям”. Отделению иммунологии, лаборатории молекулярной биологии и другим отделениям и лабораториям ФГБУ “НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева”.

## **Introduction**

Pathogenic genetic variants of PSTPIP1 (Proline-Serine-Threonine Phosphatase Interacting Protein 1) are associated with a group of autoinflammatory diseases called PAID. The PSTPIP1 protein contains the functional domains F-BAR and SH3 and is involved in the regulation of the actin cytoskeleton, as well as in the activation of inflammatory signaling pathways through the protein pyrin. It has previously been shown that pathogenic variants of PSTPIP1 can disrupt the formation of podosomes in macrophages. In this work, we studied the functional effect of the p.E250K PSTPIP1 variant in macrophages derived from primary cells. The aim of the work was to analyze the level of PSTPIP1 protein and characterize the kinetics of podosome formation in primary macrophages obtained from five patients with the E250K variant.

## **Materials and methods**

The level of PSTPIP1 protein was measured using Western blotting. The characteristics of the podosomes were evaluated by confocal microscopy in fixed cells. Macrophages transfected with LifeAct-mStayGold mRNA were used to visualize the dynamics of podosomes in living cells.

## **Results**

In macrophages of patients with the E250K variant, the level of PSTPIP1 protein was significantly reduced compared with the control. The patients showed a marked decrease in the average number of podosomes per cell compared to the control group. In addition, the proportion of cells lacking podosomes was significantly higher in macrophages with E250K. However, real-time visualization has shown that, despite the reduction in the average number of podosomes, the E250K variant significantly increases their stability.

## **Conclusions**

Our study demonstrates for the first time that the E250K mutation in the F-BAR domain of PSTPIP1 can have a dual effect on primary macrophages. On the one hand, the mutation reduces the number of cells forming podosomes, and on the other hand, it increases their stability. In addition, the E250K variant negatively affects the level of PSTPIP1 protein in macrophages. These results reveal the previously unknown role of PSTPIP1 in regulating podosome dynamics and provide new insights into the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of PAID.

## **Acknowledgements**

K. R. Butov (scientific supervisor). To the Charity Foundation "Science for Children". Department of Immunology, Laboratory of Molecular Biology and other departments and laboratories of the Federal State Budgetary Institution "NMITS DGOI named after Dmitry Rogachev".

# Исследование патогенности вариантов в функционально неописанном домене белка CORO1A

## Investigation of the pathogenicity of variants in a functionally undescribed domain of the CORO1A protein

Николаева Е.И.<sup>1,2</sup>

Nikolaeva E.I.<sup>1,2</sup>

1. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

2. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

1. Dmitry Rogachev National Medical Research Center for Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Moscow, Russia

2. Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Получено: 28.05.2025

Принято к публикации: 30.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: PPNFZJ

### Введение

Мутации в гене CORO1A ассоциированы с тяжелым комбинированным иммунодефицитом. Ранее был описан миссенс-вариант с.19C>T, p.R7C у пациента с гемизиготной микроделецией 16p11.2, приводящий к значительному снижению CORO1A и нарушению мобильности клеток. Вариант находится в N-концевом домене белка, функциональная роль которого неизвестна. Цель работы — определить функциональный эффект варианта R7C на белок CORO1A.

### Материалы и методы

Третичную структуру CORO1A предсказывали с помощью ColabFold: AlphaFold2. Протонирование анализировались алгоритмами: H++, PropKa и PypKa. Филогенетический анализ выполнен через NCBI BLAST. Для экспериментов на клеточных моделях были созданы стабильно экспрессирующие варианты CORO1A клеточные линии с помощью плазмидной липофекции (HEK293T, HeLa, NIH3T3) и лентивирусной трансдукции (Jurkat). Варианты CORO1A были проанализированы с помощью конфокальной микроскопии, Вестерн-блота и проточной цитометрии.

### Результаты

Моделирование *in silico* в AlphaFold предсказало наличие  $\pi$ -катионной связи между остатками R7 и H305 в CORO1A, что согласуется со специализированными моделями протонирования. Вариант R7C нарушает внутриклеточную локализацию CORO1A: белок диффузно распределен в клетке, в отличие от WT. Восстановление  $\pi$ -катионной связи ортогональным вариантом R7K не приводит к корректной локализации белка. Добавление конститутивно нефосфорилируемых вариантов CORO1a (S2A, T412A) также не корректировало локализации белка. Ко-иммунопреципитация варианта R7C показала отсутствие специфичной полосы белка ~45 кДа в отличие от контроля. В клеточных моделях на основе Jurkat кальциевый сигнал при активации TCR не имеет различий между вариантами и контролем.

### Выводы

Нарушение локализации при мутации R7C не связано с отсутствием  $\pi$ -катионной связи и специфическим фосфорилированием. Потенциально патогенный вариант R7C не связывается с белком массы ~45 кДа. В клеточных моделях Jurkat варианты CORO1A не имеют значимых отличий в кальциевой сигнализации через TCR по сравнению с контролем.

### Благодарности

Бутову К. Р. (научный руководитель). Благотворительному фонду “Наука-детям”. Отделению иммунологии, лаборатории молекулярной биологии и другим отделениям и лабораториям ФГБУ “НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева”.

## **Introduction**

Mutations in the CORO1A gene are associated with severe combined immunodeficiency. Previously, the missense variant c.19C>T, p.R7C was described in a patient with hemizygous microdeletion 16p11.2, leading to a significant decrease in CORO1A and impaired cell mobility. The variant is located in the N-terminal domain of the protein, the functional role of which is unknown. The aim of the work was to determine the functional effect of the R7C variant on the CORO1A protein.

## **Materials and methods**

The tertiary structure of CORO1A was predicted using ColabFold: AlphaFold2. Protonation was analyzed using the following algorithms: H++, PropKa and PypKa. The phylogenetic analysis was performed through NCBI BLAST. For experiments on cell models, stably expressing variants of CORO1A cell lines were created using plasmid lipofection (HEK293T, HeLa, NIH3T3) and lentiviral transduction (Jurkat). CORO1A variants were analyzed using confocal microscopy, Western blot, and flow cytometry.

## **Results**

In silico modeling in AlphaFold predicted the presence of a  $\pi$ -cationic bond between R7 and H305 residues in CORO1A, which is consistent with specialized protonation models. The R7C variant disrupts the intracellular localization of CORO1A: the protein is diffusely distributed in the cell, unlike WT. The restoration of the  $\pi$ -cationic bond by the orthogonal variant of R7K does not lead to the correct localization of the protein. The addition of constitutively nonphosphorylated CORO1a variants (S2A, T412A) also did not correct protein localization. Co-immunoprecipitation of the R7C variant showed the absence of a specific protein band of ~45 kDa, in contrast to the control. In Jurkat-based cell models, the calcium signal during TCR activation does not differ between variants and controls.

## **Conclusions**

The localization disorder in the R7C mutation is not associated with the absence of a  $\pi$ -cationic bond and specific phosphorylation. The potentially pathogenic R7C variant does not bind to a ~45 kDa protein. In Jurkat cell models, CORO1A variants have no significant differences in calcium signaling via TCR compared to the control.

## **Acknowledgements**

K. R. Butov (scientific supervisor). To the Charity Foundation "Science for Children". Department of Immunology, Laboratory of Molecular Biology and other departments and laboratories of the Federal State Budgetary Institution "NMITS DGOI named after Dmitry Rogachev".

# **Связь трёхстадийной динамики артериального тромба с пространственно-временной динамикой тромбина и секрецией плотных гранул**

## **The relationship of the three-stage dynamics of arterial thrombus with the spatiotemporal dynamics of thrombin and secretion of dense granules**

Бершадский Е.С.<sup>1</sup>

Bershadsky E.S.<sup>1</sup>

1. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

1. Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Получено: 26.05.2025

Принято к публикации: 30.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: RLNJWE

### **Введение**

Механизмы, отвечающие за пространственную неоднородность и трехстадийную динамику формирования артериального тромба не до конца понятны. Для теоретического анализа этих явлений была разработана трехмерная непрерывная компьютерная модель тромбообразования в артериолах мыши.

### **Материалы и методы**

Модель основана на предложенной ранее концепции ядра и оболочки тромба и принимает во внимание следующие ключевые процессы и явления: неоднородную структуру тромба, состоящего из плотного ядра и рыхлой оболочки; обратимую активацию тромбоцитов в ответ на АДФ; необратимую активацию тромбоцитов в ответ на тромбин; секрецию плотных гранул из активированных тромбином тромбоцитов, а также изменение течения крови в процессе роста тромба.

### **Результаты**

Моделирование позволили воспроизвести и предложить объяснение сложной трехстадийной динамике формирования артериального тромба, наблюдаемой *in vivo*. Начальная фаза быстрого роста тромба в модели является следствием секреции АДФ из активированных тромбином тромбоцитов, в то время как фаза постепенного снижения размеров тромба вызвана исчерпанием запасов плотных гранул в тромбоцитах ядра тромба. Долговременная стабилизация размеров тромба в модели вызвана необратимой активацией тромбоцитов оболочки тромба низкими дозами тромбина. Локализация ядра тромба в рамках модели объясняется особенностями явлений переноса тромбина внутри тромба и ярко выраженным нелинейным характером активации тромбоцитов в ответ на тромбин. Результаты модели также позволили воспроизвести и проанализировать окклюзивный и неокклюзивный сценарии роста тромба при FeCl<sub>3</sub>- индуцированном тромбозе сонной артерии мыши, а также предложить гипотезу о существенной роли АДФ- зависимой оболочки тромба для формирования гемостатической пробки в условиях проникающего повреждения.

### **Выводы**

Результаты моделирования позволили предложить детальные механизмы, объясняющие сложную пространственно-временную динамику формирования артериального тромба, а также важную роль оболочки тромба в условиях гемостаза.

### **Благодарности**

к.ф.-м.н. Нечипуренко Д. Ю.

## **Introduction**

The mechanisms responsible for spatial heterogeneity and the three-stage dynamics of arterial thrombus formation are not fully understood. For the theoretical analysis of these phenomena, a three-dimensional continuous computer model of thrombosis in mouse arterioles was developed.

## **Materials and methods**

The model is based on the previously proposed concept of the nucleus and shell of a thrombus and takes into account the following key processes and phenomena: the heterogeneous structure of a thrombus consisting of a dense core and a loose shell; reversible platelet activation in response to ADP; irreversible platelet activation in response to thrombin; secretion of dense granules from thrombin-activated platelets, as well as a change in blood flow during the growth of a blood clot.

## **Results**

The simulation results allowed us to reproduce and offer an explanation for the complex three-stage dynamics of arterial thrombus formation observed in vivo. The initial phase of rapid thrombus growth in the model is a consequence of ADP secretion from thrombin-activated platelets, while the phase of gradual decrease in thrombus size is caused by the depletion of dense granules in platelets of the thrombus nucleus. The long-term stabilization of the thrombus size in the model is caused by irreversible activation of platelets of the thrombus shell by low doses of thrombin. The localization of the thrombus nucleus within the framework of the model is explained by the peculiarities of thrombin transfer phenomena inside the thrombus and the pronounced nonlinear nature of platelet activation in response to thrombin. The results of the model also made it possible to reproduce and analyze occlusive and non-occlusive scenarios of thrombus growth in mouse FeCl<sub>3</sub>-induced carotid artery thrombosis, as well as to propose a hypothesis about the essential role of the ADP-dependent thrombus envelope for the formation of a hemostatic plug in conditions of penetrating damage.

## **Conclusions**

The simulation results allowed us to propose detailed mechanisms explaining the complex spatiotemporal dynamics of arterial thrombus formation, as well as the important role of the thrombus shell in hemostasis.

## **Acknowledgements**

PhD Nechipurenko D. Y.

# **Влияние размера тромба на динамику свертывания плазмы крови при артериальном тромбообразовании**

## **The effect of thrombus size on plasma coagulation dynamics in arterial thrombosis**

Мегалинский А.Д.<sup>1</sup>

Megalinskii A.D.<sup>1</sup>

1. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

1. Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Получено: 27.05.2025

Принято к публикации: 30.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: NCEUPM

### **Введение**

Для эффективного поддержания работы системы гемостаза необходимо тесное взаимодействие между тромбоцитами и плазменным свёртыванием крови. Несмотря на то, что ключевые молекулярные механизмы первичного и вторичного гемостаза хорошо охарактеризованы, остаются малоизученными принципы, регулирующие динамику образования артериальных тромбов в условиях потока. Известно, что кровоток может существенно ингибировать реакции каскада свёртывания крови, разбавляя активные факторы, и что первичный агрегат тромбоцитов может обеспечивать их защиту от потока. В данной работе теоретически исследуется роль размера тромбоцитарного агрегата в создании локализованной области с минимальной скоростью потока для ускорения процессов свёртывания внутри тромба.

### **Материалы и методы**

Для моделирования течения крови использовались стандартные методы вычислительной гидродинамики. В среде Comsol Multiphysics были получены численные решения уравнений Навье-Стокса для нестационарных процессов в системе с химическими реакциями, конвекцией и диффузией веществ в двумерном приближении. Кинетика генерации тромбина и образования фибрина описывалась в модели свёртывания через путь тканевого фактора. Взаимодействующие вещества как доставлялись потоком, так и генерировались на месте повреждения. Повреждённая поверхность сосуда была покрыта частично проницаемой для потока оболочкой, которая имитировала гомогенный тромб, состоящий из слабо активированных тромбоцитов.

### **Результаты**

Компьютерная модель предсказывает, что в случае повреждений, экспонирующих тканевый фактор низкой концентрации, формирование достаточно крупного (более 20% от диаметра сосуда) тромба необходимо для минимизации ингибирующего эффекта потока, активной наработки тромбина и образования фибринового сгустка.

### **Выводы**

При повреждениях сосуда, сопровождающихся экспонированием низкой концентрации тканевого фактора, образование крупного тромба играет существенную роль в усилении работы плазменного свёртывания путем создания защищенной от потока среды. Этот процесс важен для образования фибриновой пробки у места повреждения и подчеркивает физическую связь между агрегацией тромбоцитов и реакциями свёртывания.

### **Благодарности**

к.ф.-м.н. Нечипуренко Дмитрий Юрьевич.

## **Introduction**

The interplay between platelets and plasma coagulation is essential for effective hemostasis. While the molecular mechanisms of platelet aggregation are well characterized, the dynamics of arterial thrombus formation under high shear flow remain poorly understood. It is known that blood flow can significantly hinder coagulation by diluting activated factors, and that a primary platelet aggregate may provide a shelter for plasma coagulation. In this study, we theoretically investigate the role of the size of a platelet aggregate in providing a localized environment with minimal flow velocities for facilitating intrathrombus coagulation.

## **Materials and methods**

Standard computational fluid dynamics methods were used to simulate blood flow. Numerical solutions to the Navier-Stokes equations were obtained in Comsol Multiphysics software for non-stationary processes involving chemical reactions, convection, and diffusion of species, in a two-dimensional approximation. Thrombin generation and fibrin formation kinetics were described via tissue factor pathway coagulation model. Reactants were both delivered by flow and generated locally at the site of injury. The damaged vessel surface was covered with a semi-permeable shell representing a homogeneous thrombus composed of weakly activated platelets.

## **Results**

The computational model predicts that in injuries exposing low concentrations of tissue factor, the formation of a sufficiently large (exceeding 20% of the vessel diameter) thrombus is required to minimize the inhibitory effect of flow, enabling active thrombin production and fibrin clot formation..

## **Conclusions**

In vascular injuries associated with low tissue factor exposure, the formation of a large thrombus plays a critical role in facilitating coagulation by creating a sheltered environment. This process is essential for stabilizing the injury site with a fibrin-rich patch, highlighting the critical interplay between platelet aggregation and coagulation reactions in such types of the injuries.

## **Acknowledgements**

Dmitry Nechipurenko, Ph.D.

# **Кровотечения и локальная гемодинамика при травматическом повреждении сосудов**

## **Bleeding and local hemodynamics in traumatic vascular injury**

Быков Г.А.<sup>1</sup>

Вуков Г.А.<sup>1</sup>

1. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

1. Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Получено: 29.05.2025

Принято к публикации: 30.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: FOCUTD

### **Введение**

При травмировании стенки сосуда для устранения повреждения и остановки кровотечения происходит запуск системы гемостаза. Гемодинамика управляет тромбоцитарным и плазменным звеньями системы гемостаза в области возникшей патологии. На данный момент характеристики потока крови в области патологии изучены недостаточно. Необходимо охарактеризовать новые гемодинамические условия, возникшие в результате повреждения как локально в области раны, так и глобально во всей окружающей системе сосудов.

### **Материалы и методы**

Была разработана гибридная многомасштабная компьютерная модель гемодинамики, дающая детальную информацию о скоростях движения крови в области прокола сосуда и описывающая объёмные расходы и давления крови в окружающей рану системе сосудов. Рассматривается ситуация нарушении целостности стенки вены руки человека.

### **Результаты**

При проколе вены руки возникают высокие скорости сдвига на краю раны, нелинейно зависящие от размера раны. Значительные изменения давления не распространяются дальше концов повреждённого сосуда.

### **Выводы**

Невозможно дифференцировать физиологический процесс гемостаз и патологический процесс тромбоз по значению скорости сдвига. Схлопывание окружающих сосудов в результате прокола маловероятно.

### **Благодарности**

д.ф.-м.н., профессор РАН Пантелеев М.А. (научный руководитель)

## ***Introduction***

In case of vessel wall trauma hemostasis system is initiated to repair the injury and arrest the bleeding. Hemodynamics rules both primary and secondary hemostasis in the area of pathology. To the moment hemodynamic conditions there remain poorly understood.

It is essential to characterize novel hemodynamic conditions arising both locally, near the injury, and globally, in the adjacent vessel tree.

## ***Materials and methods***

Computer simulations of local and global blood circulation are conducted in hybrid multidimensional computer model. Blood velocities, pressures and volumetric flow rates are obtained in case of venous trauma in human arm.

## ***Results***

In venous injury, high shear rates arise on the wound edge. Shear rates depend nonlinearly on the wound size. Essential pressure changes do not distribute farther than the damaged vessel's ends.

## ***Conclusions***

It is impossible to differ physiological hemostasis from pathological thrombosis utilizing value of shear rate. Collapse of adjacent vessels in case of injury is unlikely.

## ***Acknowledgements***

M.A. Panteleev, PhD, Prof. of the Russian Academy of Sciences (Scientific supervisor)

# Методика исследования фибринолиза в тромбе *in vitro*

## Method of investigation of fibrinolysis in a blood clot *in vitro*

Д.А. Блескин<sup>1</sup>, Д. Ю. Нечипуренко<sup>1</sup>, М.А. Пантелеев<sup>1</sup>, С.И. Обыденный<sup>1</sup>

D.A. Bleskin<sup>1</sup>, D. Y. Necipurenko<sup>1</sup>, M.A. Panteleev<sup>1</sup>, S.I. Obydennyi<sup>1</sup>

1. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

1. Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Получено: 31.05.2025

Принято к публикации: 02.06.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: НКЕНМК

### Введение

Системы свертывания крови и фибринолиза выполняют роль сохранения жизнеобеспечения организма в ответ на повреждение сосудов. При нарушении целостности сосудов в работу вступает свертывание крови и тромбообразование. Когда функции тромба выполнены, активируется система фибринолиза, которая отвечает за разрушение фибринового сгустка и целью которой является ликвидация тромба. Процесс лизиса сгустков и его влияние на тромбы изучен недостаточно. Целью работы является исследование взаимодействия системы фибринолиза с тромбом.

### Материалы и методы

Для формирования тромбов использовались проточные камеры с активатором тромбообразования в виде фибриллярного коллагена с тканевым фактором. В кровь добавлялись флуоресцентные зонды, съемка проводилась на флуоресцентном микроскопе. Для запуска фибринолиза применялся тканевый активатор плазминогена.

### Результаты

Была разработана экспериментальная *in vitro* модель формирования тромбов с функционирующей системой свертывания крови и возможностью инициации фибринолиза в нужный момент времени.

При формировании тромба с активированной системой свертывания в тромбах были выделены три зоны:

- 1) Зона высоких тромбов, находящаяся в самом начале области активации. Фибрина в ней мало.
- 2) Зона низких тромбов, наблюдается сразу после первой зоны и до конца области активации, и характеризуется наличием большого количества фибрина.
- 3) Зона «хвоста» - находится сразу после зоны активации, ниже по потоку, представляет собой полотно из фибрина и налипших на него тромбоцитарных агрегатов.

Так же описаны эндогенный и экзогенный фибринолиз. В случае первого, лизис начинается из центра к периферии тромба; в случае второго, от края тромба и в 2 стороны.

### Выводы

Разработанный подход является перспективным методом для исследования фибринолиза в приближенных к натурным условиям. Формирование фибриновой оболочки на тромбоцитарном агрегате является фактором остановки роста тромба.

## **Introduction**

Blood coagulation and fibrinolysis systems play the role of maintaining the body's life support in response to vascular damage. In case of violation of the integrity of blood vessels, blood clotting and thrombosis come into play. When the functions of the thrombus are completed, the fibrinolysis system is activated, which is responsible for the destruction of the fibrin clot and the purpose of which is to eliminate the thrombus. The process of clot lysis and its effect on blood clots has not been sufficiently studied. The aim of the work is to study the interaction of the fibrinolysis system with a blood clot.

## **Materials and methods**

For the formation of blood clots, flow chambers with a thrombosis activator in the form of fibrillar collagen with a tissue factor were used. Fluorescent probes were added to the blood, and the image was taken with a fluorescence microscope. A tissue plasminogen activator was used to trigger fibrinolysis.

## **Results**

An experimental in vitro model of blood clot formation with a functioning blood clotting system and the ability to initiate fibrinolysis at the right time was developed. During the formation of a blood clot with an activated coagulation system, three zones were identified in the blood clots:

- 1) The area of high blood clots, located at the very beginning of the activation area. There is little fibrin in it.
- 2) The zone of low blood clots is observed immediately after the first zone and until the end of the activation region, and is characterized by the presence of a large amount of fibrin.
- 3) The "tail" zone is located immediately after the activation zone, downstream, and is a web of fibrin and platelet aggregates adhering to it.

Endogenous and exogenous fibrinolysis are also described. In the case of the endogenous fibrinolysis, lysis begins from the center to the periphery of the thrombus; in the case of the exogenous fibrinolysis, from the edge of the thrombus and in 2 directions.

## **Conclusions**

The developed approach is a promising method for the study of fibrinolysis in conditions close to nature. The formation of a fibrin sheath on a platelet aggregate is a factor for stopping the growth of a blood clot.

# **Изучение влияния ориентации фибрилл коллагена на тромбоцитарный гемостаз**

## **Study of the effect of collagen fibrills orientation on platelet hemostasis**

Мельникова Е.А.<sup>1</sup>

Melnikova E.A.<sup>1</sup>

1. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

1. Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Получено: 04.05.2025

Принято к публикации: 10.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: TUICDJ

### **Введение**

Субэндотелиальный матрикс характеризуется гетерогенной структурой. Известно, что в артериях и артериолах коллагеновые волокна непосредственно под эндотелием ориентированы в основном параллельно кровотоку и содержат коллаген III и I типов. Однако значение такой организации в инициации быстрого гемостатического ответа остается неясным.

### **Материалы и методы**

Микрофлюидные PDMS камеры использовались для моделирования поврежденного сосуда.

Ориентированные волокна коллагена I типа (Chrono-Par®) наносились при помощи микрофлюидики. Гирудинированная цельная кровь здоровых добровольцев прокачивалась через каналы в течение 5 минут на скорости сдвига 200, 1000 и 2000 с<sup>-1</sup>.

DiOS6 использовался для визуализации тромбоцитов.

Эксперименты проводились с использованием эпифлуоресцентного микроскопа и визуализации в реальном времени. Полученные изображения анализировались с помощью программного обеспечения ImageJ.

### **Результаты**

Ориентированные вдоль потока коллагеновые фибриллы более тромбогенны при высокой скорости сдвига по сравнению с поперечными;

Для достижения стабильной адгезии тромбоциту необходимо взаимодействовать с активатором в течение нескольких секунд;

Тромбоциты дольше взаимодействуют с продольными фибриллами, что приводит к большему количеству стабильно прикрепленных тромбоцитов;

На высокой скорости сдвига тромбоциты перемещаются вдоль богатых vWF продольных фибрилл;

Эти фибриллы представляют собой небольшую часть оптически видимых фибрилл и положительно окрашиваются антителами к коллагену III типа, что указывает на соответствующую примесь коллагена типа III в стандартных препаратах коллагена I типа.

### **Выводы**

Аксиальная ориентация коллагеновых волокон, наблюдаемая в субэндотелиальном слое *in vivo* может способствовать быстрому гемостатическому ответу на поверхностные повреждения сосудов, поскольку продольные коллагеновые волокна более тромбогенны при высоких скоростях сдвига.

Результаты стандартных проточных *in vitro* экспериментов с коллагеном I типа, по-видимому, сильно зависят от примеси III типа при высоких скоростях сдвига.

### **Благодарности**

к.ф.-м.н Нечипуренко Д.Ю.

## **Introduction**

The subendothelial matrix is characterized by a heterogeneous structure. It is known that in arteries and arterioles, collagen fibers directly under the endothelium are oriented mainly parallel to the blood flow and contain types III and I collagen. However, the significance of such an organization in initiating a rapid hemostatic response remains unclear.

## **Materials and methods**

Microfluidic PDMS cameras were used to simulate a damaged vessel. Oriented type I collagen fibers (Chrono-Par®) were applied using microfluidics. The hirudinized whole blood of healthy volunteers was pumped through the channels for 5 minutes at a shear rate of 200, 1000 and 2000 s<sup>-1</sup>. DiOC6 was used for platelet imaging. The experiments were conducted using an epifluorescence microscope and real-time imaging. The resulting images were analyzed using ImageJ software.

## **Results**

Collagen fibrils oriented along the flow are more thrombogenic at a high shear rate compared to transverse fibrils. To achieve stable adhesion, the platelet must interact with the activator for several seconds. Platelets interact longer with longitudinal fibrils, which leads to a larger number of stably attached platelets. At a high shear rate, platelets move along vWF-rich longitudinal fibrils. These fibrils represent a small part of the optically visible fibrils and could be positively stained with antibodies to type III collagen, which indicates a corresponding admixture of type III collagen in standard type I collagen preparations.

## **Conclusions**

The axial orientation of collagen fibers observed in the subendothelial layer in vivo may contribute to a rapid hemostatic response to superficial vascular damage, since longitudinal collagen fibers are more thrombogenic at high shear rates. The results of standard in vitro flow experiments with type I collagen seem to strongly depend on type III impurities at high shear rates.

## **Acknowledgements**

PhD, M.N. Nechipurenko, D.Y.

# **Влияние структуры положительной обратной связи на пороговые свойства ферментативных каскадов**

## **The influence of the positive feedback structure on the threshold properties of enzymatic cascades**

Кадыров Т.И.<sup>1</sup>

Kadyrov T.I.<sup>1</sup>

1. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

1. Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Получено: 31.05.2025

Принято к публикации: 02.06.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: ICNDHP

### **Введение**

Положительные обратные связи (ПОС), их кинетика и структура оказывают большое влияние на динамические свойства ферментативных каскадов, в частности на их пороговые свойства. Однако в литературе существует несколько различных подходов к определению порога системы, при этом в зависимости от используемого определения влияние свойств ПОС на пороговые свойства различно. В настоящей работе проведено исследование влияния структуры и кинетики ПОС в упрощённой модели сигнального ферментативного каскада на его пороговые свойства.

### **Материалы и методы**

В работе использовалось математическое и численное моделирование. Был построен ряд упрощённых моделей ферментативных каскадов с ПОС в гомогенном растворе на основе каскада свёртывания крови. Математические модели представляли собой системы ОДУ. Численное интегрирование и исследование моделей проводилось с помощью реализации на языке Python.

### **Результаты**

Было показано, что в зависимости от структуры ПОС в ферментативных каскадах может существовать два различных типа порогов – порог начального уровня активатора относительно эфффектора системы и порог переключения системы между двумя устойчивыми состояниями (при наличии бистабильности). Наличие кофактора в положительной обратной связи делает возможным сигмоидальную форму кривой сигнал-ответ, при которой интервал уровней активатора, соответствующих промежуточным уровням эфффектора, существенно сокращается (по сравнению с ПОС без кофактора). Также было показано, что в усиливающих каскадах более длинная ПОС приводит к более низкому порогу активации, а в ослабляющих – к более высокому для обоих типов порога.

### **Выводы**

Наличие кофактора в ПОС является важным структурным фактором, влияющим на диапазон уровней активатора, приводящих к неполному ответу системы, что в случае системы свёртывания крови может приводить к недостаточно плотному сгустку. Два рассмотренных типа порогов имеют разную количественную зависимость от параметров системы, но одинаково качественно связаны с длиной ПОС.

### **Благодарности**

научный руководитель - д.ф.-м.н., проф. Пантелеев Михаил Александрович.

## **Introduction**

Positive feedback loops (PFL), their kinetics and structure have a great influence on the dynamic properties of enzymatic cascades, in particular on their threshold properties. However, there are several different approaches to determining the threshold of a system in the literature, and depending on the definition used, the effect of PFL properties on threshold properties varies. In this paper, the influence of the structure and kinetics of the PFL in a simplified model of the signaling enzymatic cascade on its threshold properties is investigated.

## **Materials and methods**

Mathematical and numerical modeling were used in the work. A number of simplified models of enzymatic cascades with PFL in a homogeneous solution based on the blood coagulation cascade were constructed. Mathematical models were systems of HDEs. Numerical integration and model research were carried out using a Python implementation.

## **Results**

It has been shown that, depending on the PFL structure, two different types of thresholds can exist in enzymatic cascades – the threshold of the initial level of the activator relative to the effector of the system and the threshold for switching the system between two stable states (in the presence of bistability). The presence of a cofactor in positive feedback makes possible the sigmoidal shape of the signal-response curve, in which the range of activator levels corresponding to intermediate effector levels is significantly reduced (compared to PFL without a cofactor). It has also been shown that in amplifying cascades, a longer PFL leads to a lower activation threshold, and in attenuating cascades, to a higher threshold for both types.

## **Conclusions**

The presence of a cofactor in the PFL is an important structural factor affecting the range of activator levels, leading to an incomplete system response, which in the case of a blood coagulation system can lead to an insufficiently dense clot. The two types of thresholds considered have different quantitative dependence on the system parameters, but they are equally qualitatively related to the PFL length.

## **Acknowledgements**

scientific supervisor - PhD, prof. Panteleev, M. A.

# Механизмы возникновения колебаний концентрации ионов кальция в тромбоцитах человека

## *Mechanisms of calcium oscillations in human platelets*

Молоткова Е.А.<sup>1</sup>, Шахиджанов С.С.<sup>1</sup>, Шепелюк Т.О.<sup>1</sup>

Molotkova E.A.<sup>1</sup>, Shakhidzhanov S.S.<sup>1</sup>, Shepeliuk T.O.<sup>1</sup>

1. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

1. Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Получено: 31.05.2025

Принято к публикации: 02.06.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: OYYGNR

### Введение

Тромбоциты играют ключевую роль в остановке артериальных кровотечений и тромбозе. В процессе активации в тромбоцитах возникают осцилляции концентрации  $Ca^{2+}$ . Из-за малого объёма тромбоцита (6–10 фемтолитров) осцилляции  $Ca^{2+}$  крайне стохастичны. Математически возникновение осцилляций в стохастической системе можно объяснить либо существованием в системе предельного цикла (ПЦ) - генератора регулярных импульсов, либо же самоиндуцированным стохастическим резонансом (ССР) - стохастическим механизмом возникновения импульсов без генератора. Фундаментальный интерес представляет вопрос о том, какой из механизмов реализуется в тромбоцитах человека: ПЦ или ССР.

### Материалы и методы

На основе модели Ли-Ринцела (1994) построена стохастическая модель возникновения импульсов концентрации  $Ca^{2+}$  в ПЦ и ССР. С помощью  $Ca^{2+}$ -специфичного флуоресцентного красителя Calbryte-590 AM отслеживалась динамика концентрации  $Ca^{2+}$  в одиночных тромбоцитах здоровых доноров и тромбоцитах пациента с макротромбоцитопенией, адгезированных к иммобилизованному фибриногену.

### Результаты

Моделирование показало, что ПЦ и ССР неразличимы для клеток нормального размера (объём < 20 фемтолитров): оба механизма вызывают нерегулярные стохастические пики. Однако, в больших клетках (объём > 20 фемтолитров) ПЦ генерирует регулярные импульсы, а ССР вызывает нерегулярные редкие импульсы. Тромбоциты нормального размера у пациента демонстрировали нерегулярные кальциевые пики ( $12,3 \pm 1,2$  пиков/мин), аналогичные здоровым контролям ( $14,2 \pm 0,3$  пиков/мин), тогда как крупные тромбоциты пациента (20 - 80 фл) проявляли меньше кальциевых пиков ( $5,7 \pm 1,8$  пиков/мин) и как регулярные, так и нерегулярные осцилляционные паттерны.

### Выводы

Уменьшение частоты кальциевых пиков в больших тромбоцитах пациента, вероятно, вызвано их увеличенным размером. По-видимому, тромбоцитах могут реализовываться оба механизма генерации импульсов: и ПЦ и ССР.

### Благодарности

академик, д.б.н. Атауллаханов Фазоил Иноятович.

## **Introduction**

Platelets play a key role in stopping arterial bleeding and thrombosis. During activation, oscillations of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration occur in platelets. Due to the small volume of a platelet (6–10 fL),  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations are highly stochastic. Mathematically, the emergence of oscillations in a stochastic system can be explained either by the presence of a limit cycle (LC) – a generator of regular pulses, or by self-induced stochastic resonance (SSR), a stochastic mechanism of impulse generation. A fundamental question arises: which of these mechanisms is present in human platelets: LC or SSR?

## **Materials and methods**

Based on the Li-Rinzel model of calcium signaling (1994) we developed a stochastic model of  $\text{Ca}^{2+}$  impulse generation with a LC and with SSR. At single-cell level, we monitored thrombin-induced activation of human platelets adherent to immobilized fibrinogen under flow. Using  $\text{Ca}^{2+}$ -specific fluorescent dye Calbryte-590 AM, we tracked the dynamics of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in platelets from healthy donors and platelets from a patient with macrothrombocytopenia.

## **Results**

We found that in our model LC and SSR are indistinguishable in normal-sized cells (volume < 20 fL): both mechanisms produce irregular stochastic calcium spikes. However, in larger cells (volume > 20 fL), LC generates regular pulses, while SSR causes irregular, rare pulses. Normal-sized patient platelets exhibited irregular spiking ( $12.3 \pm 1.2$  spikes/min) similar to healthy controls ( $14.2 \pm 0.3$  spikes/min), while large patient platelets (20–80 fL) showed fewer spikes ( $5.7 \pm 1.8$  spikes/min) and both regular and irregular oscillatory patterns.

## **Conclusions**

The reduced frequency of calcium spikes in patient large platelets is likely due to their increased size. It appears that both impulse generation mechanism – LC and SSR – can be present in platelets.

## **Acknowledgements**

Academician of the Russian Academy of Sciences, PhD in Biological Sciences, PhD in Physical and Mathematical Sciences Fazoil Inoyatovich Ataullakhanov (scientific supervisor).

# Исследование старшего показателя Ляпунова кальциевых осцилляций тромбоцитов

## Investigation of the senior Lyapunov exponent of platelet calcium oscillations

Ведерников Л. С.<sup>1</sup>

Vedernikov L. S.<sup>1</sup>

1. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

1. Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Получено: 30.05.2025

Принято к публикации: 31.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: FCQOEZ

### Введение

Изучение роли концентрации кальция в клетках привело к важному открытию — при появлении внешнего стимула концентрация в клетках начинает колебаться, причем тип и количество внешнего стимула влияют на ее амплитуду и частоту колебаний. В тромбоцитах человека данные осцилляции имеют крайне сложную динамику, близкую к хаотической. Поэтому, в данной работе был предложен метод оценки такого параметра хаотических временных реализаций, как старший показатель Ляпунова. Данный метод сможет показать, что кальциевые осцилляции действительно имеют хаотическую природу и позволит численно оценить степень активации тромбоцитов в ответ на внешние стимулы.

### Материалы и методы

В работе для оценки старшего показателя Ляпунова временных рядов используется метод Розенштейна. Для восстановления странного аттрактора используется метод задержки, в котором время задержки  $\tau$  берется фиксировано малым, примерно три точки массива, а размерность фазового пространства определяется методом ложных соседей. Оценивались кальциевые осцилляции тромбоцитов здоровых доноров, закрепленных на коллагеновой подложке и подложке VM64. В первом и втором случае было по 6 здоровых доноров. В качестве активаторов использовалось 10 мкМ АДФ для средней активации и 5 нМ тромбина для сильной активации тромбоцитов.

### Результаты

По результатам расчетов для двух разных подложек были построены распределение показателя Ляпунова для всех трех случаев. По результатам видно, что не активированные тромбоциты демонстрируют сложную хаотическую динамику, однако многие кальциевые осцилляции имеют и регулярную динамику. При средней активации тромбоцитов все осцилляции переходят в хаотическую динамику, однако при сильной активации снова появляются разделение на регулярные и хаотические осцилляции.

### Выводы

Распределение показателя Ляпунова демонстрирует разделение не активированных тромбоцитов на регулярные и хаотические. Средняя активация тромбоцитов выводит регулярные осцилляции в хаотические, а сильная активация снова демонстрирует разделение на регулярные и хаотические.

### Благодарности

д.ф.-м.н., зав. лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии ЦТП ФХФ РАН, Свешникова А.Н.

## **Introduction**

Studying the role of calcium concentration in cells has led to an important discovery — when an external stimulus appears, the concentration in cells begins to fluctuate, and the type and amount of external stimulus affect its amplitude and frequency of fluctuations. In human platelets, these oscillations have extremely complex dynamics, close to chaotic. Therefore, in this paper, a method was proposed for estimating such a parameter of chaotic time realizations as the senior Lyapunov exponent. This method will be able to show that calcium oscillations really have a chaotic nature and will allow us to numerically assess the degree of platelet activation in response to external stimuli.

## **Materials and methods**

The Rosenstein method is used to estimate the senior Lyapunov exponent of time series. To restore the strange attractor, the delay method is used, in which the delay time  $t$  is taken to be fixed small, approximately three points of the array, and the dimension of the phase space is determined by the false neighbors method. The calcium oscillations of platelets from healthy donors fixed on a collagen substrate and a VM64 substrate were evaluated. In the first and second cases, there were 6 healthy donors each. 10 microns of ADP were used as activators for moderate activation and 5 nM of thrombin for strong platelet activation.

## **Results**

Based on the results of calculations for two different substrates, the distribution of the Lyapunov exponent was constructed for all three cases. The results show that non-activated platelets exhibit complex chaotic dynamics, but many calcium oscillations also have regular dynamics. With average platelet activation, all oscillations turn into chaotic dynamics, but with strong activation, the division into regular and chaotic oscillations reappears.

## **Conclusions**

The distribution of the Lyapunov exponent demonstrates the division of non-activated platelets into regular and chaotic ones. An average platelet activation turns regular oscillations into chaotic ones, and a strong activation again demonstrates the separation into regular and chaotic ones.

## **Acknowledgements**

PhD, Head of Laboratories of Intracellular Signaling and Systems Biology of the Central Research Institute of the Russian Academy of Sciences, Sveshnikova A.N.

# **Взаимосвязь активности митохондрий и внутриклеточной кальциевой сигнализации тромбоцитов человека**

## **The relationship between mitochondrial activity and intracellular calcium signaling of human platelets**

Мишуков А. А.<sup>1,2</sup>

Mishukov A. A.<sup>1,2</sup>

1. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

2. НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

1. Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

2. FGBU "NMITS DGOI named after Dmitry Rogachev" Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Получено: 30.05.2025

Принято к публикации: 31.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: GZAJUA

### **Введение**

Тромбоциты являются безъядерными форменными элементами крови, чьей первичной функцией является формирование гемостатических пробок в местах повреждения сосудов. Тромбоциты содержат митохондрии, необходимые для синтеза АТФ, а также регуляции процессов активации тромбоцитов. Митохондрии накапливают ионы  $Ca^{2+}$ , стимулирующие активность ферментов цикла Кребса и дыхательной цепи, что усиливает выработку АТФ. При этом, когда концентрация  $Ca^{2+}$  в матриксе превышает некоторый порог, происходит открытие mPTP-поры, что ведет к некротической гибели и формированию прокоагулянтного фенотипа активированного тромбоцита. Таким образом, функции митохондрий тесно связаны с внутриклеточной кальциевой сигнализацией, что подчеркивает необходимость комплексной оценки этих систем для изучения механизмов активации тромбоцитов.

### **Материалы и методы**

Непрерывная проточная цитометрии суспензии тромбоцитов человека, нагруженных кальций-чувствительным зондом Fura Red и потенциал-чувствительным зондом DiOC3(6). Съемка осуществлялась на проточном цитометре FACS Canto II.

### **Результаты**

Активация тромбоцитов пептидом TRAP-6 показала выраженный дозо-зависимый эффект в мобилизации кальция, оцениваемой по флуоресценции Fura Red, и гиперполяризации митохондрий, отслеживаемой по флуоресценции DiOC3(6). Так добавление 0,225 мкМ TRAP-6 индуцировало мобилизацию кальция в  $0,135 \pm 0,035$  единицы и увеличение флуоресценции DiOC3(6) на  $2,85 \pm 1,02$  %, 1,11 мкМ TRAP-6 –  $0,55 \pm 0,07$  единицы и  $9,39 \pm 3,27$  %, 4,45 мкМ TRAP-6 –  $0,75 \pm 0,04$  единицы и  $16,14 \pm 3,97$  %. Тест ранговой корреляции Спирмена показал наличие сильной положительной корреляции между мобилизацией кальция и гиперполяризацией митохондрий ( $r = 0,98$ ,  $p < 0,001$ ).

### **Выводы**

Нами было показана практически линейная зависимость параметра гиперполяризации митохондрий от мобилизации кальция при активации тромбоцитов. Выявленная зависимость может послужить основой для разработки методов оценки функций митохондрий тромбоцитов в норме и патологии.

### **Благодарности**

д.ф.-м.н, проф., Свешникова А.Н.

## **Introduction**

Platelets are non-nuclear shaped elements of blood, whose primary function is the formation of hemostatic plugs in places of vascular damage. Platelets contain mitochondria necessary for the synthesis of ATP, as well as the regulation of platelet activation processes. Mitochondria accumulate  $\text{Ca}^{2+}$  ions, which stimulate the activity of enzymes of the Krebs cycle and the respiratory chain, which enhances the production of ATP. At the same time, when the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in the matrix exceeds a certain threshold, the mPTP pore opens, which leads to necrotic death and the formation of a procoagulant phenotype of an activated platelet. Thus, mitochondrial functions are closely related to intracellular calcium signaling, which underscores the need for a comprehensive assessment of these systems to study the mechanisms of platelet activation.

## **Materials and methods**

Continuous flow cytometry of a suspension of human platelets loaded with a calcium-sensitive Fura Red probe and a potential-sensitive DiOC3(6) probe. The survey was carried out on a FACS Canto II flow cytometer.

## **Results**

Platelet activation with TRAP-6 peptide showed a pronounced dose-dependent effect in calcium mobilization, assessed by Fura Red fluorescence, and mitochondrial hyperpolarization, monitored by DiOC3(6) fluorescence. Thus, the addition of  $0.225 \mu\text{m}$  TRAP-6 induced calcium mobilization of  $0.135 \pm 0.035$  units and an increase in DiOC3(6) fluorescence by  $2.85 \pm 1.02\%$ ,  $1.11 \mu\text{m}$  TRAP-6 –  $0.55 \pm 0.07$  units and  $9.39 \pm 3.27\%$ ,  $4.45 \mu\text{m}$  TRAP-6 –  $0.75 \pm 0.04$  units and  $16.14 \pm 3.97\%$ . Spearman's rank correlation test showed a strong positive correlation between calcium mobilization and mitochondrial hyperpolarization ( $\rho = 0.98$ ,  $p < 0.001$ ).

## **Conclusions**

We have shown an almost linear dependence of the mitochondrial hyperpolarization parameter on calcium mobilization during platelet activation. The revealed dependence can serve as a basis for the development of methods for assessing the functions of platelet mitochondria in normal and pathological conditions.

## **Acknowledgements**

PhD, prof., Sveshnikova A.N.

# ***X-сцепленная агаммаглобулинемия ослабляет кальциевый ответ одиночных тромбоцитов на активацию АДФ и тромбином***

## ***X-Linked Agammaglobulinemia Attenuates Calcium Responses in Single Platelets upon Activation with ADP and Thrombin***

Галкина С. В.<sup>1,2</sup>

Galkina S. V.<sup>1,2</sup>

1. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

2. НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

1. Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

2. FGBU "NMITS DGOI named after Dmitry Rogachev" Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Получено: 30.05.2025

Принято к публикации: 31.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: KBRIWZ

### **Введение**

Тромбоциты — это фрагменты клеток крови, отвечающие за свертывание и тромбообразование. Кальциевая сигнализация регулирует функциональные ответы тромбоцитов на активацию: дегрануляцию, активацию интегринов, прокоагулянтную активность, инициацию плазменного звена свертывания крови, синтез и секрецию тромбоксана А<sub>2</sub> и др. X-сцепленная агаммаглобулинемия (XLA) — генетическое заболевание, при котором нарушается процесс созревания В-клеток, — сопровождается также отклонениями в кальциевой сигнализации. Например, нехватка экспрессии тирозинкиназы Брутона (ВТК) значительно снижает агрегацию и секрецию плотных гранул тромбоцитов в ответ на активацию коллагеном у пациентов с XLA.

Ранее нами было показано, что кальциевые ответы одиночных тромбоцитов человека гетерогенны. Мы выделили четыре типа кальциевого ответов тромбоцитов: «нет ответа» (I) с редкими одиночными всплесками кальция, «слабый ответ» (II) с множественными спайками кальция, не формирующими кластеры, «сильный ответ» (III) с множественными кластерами и «стабильно сильный ответ» (IV) с устойчиво высоким уровнем кальция, приводящим к гибели клетки. Целью данной работы является оценка гетерогенности кальциевых ответов одиночных тромбоцитов пациентов с XLA на активацию АДФ и тромбином по сравнению со здоровыми педиатрическими донорами.

### **Материалы и методы**

В работе использовалась цельная венозная кровь пациентов с X-сцепленной агаммаглобулинемией и здоровых педиатрических доноров (антикоагулянт гирудин). Исследование гетерогенности кальциевых ответов тромбоцитов происходило при помощи флуоресцентной микроскопии. Окрашенная флуоресцентным зондом CalBryte 590 кровь прокачивалась через проточные камеры с адгезивными подложками двух видов (коллаген 1 типа и антитела к CD31). Несевшие клетки смывались буфером Тирода, далее производилась съемка в присутствии раствора активаторов 10 мкМ АДФ и 5 нМ тромбина в буфере Тирода.

### **Результаты**

Нами было показано, что в условиях и подложки коллаген, и подложки анти-CD31 кальциевый ответ тромбоцитов пациентов с XLA ослаблен для всех типов активации. Базовая активация (вклад адгезивной подложки в отсутствие АДФ и тромбина) более ослаблена по сравнению с активацией АДФ и активацией АДФ и тромбином. Адгезия тромбоцитов пациентов понижена по сравнению со здоровыми донорами.

### **Выводы**

Таким образом, нехватка экспрессии ВТК ослабляет кальциевый ответ одиночных тромбоцитов на активацию АДФ и тромбином, нарушает их адгезию.

### **Благодарности**

д.ф.-м.н, проф., Свешникова А.Н.

## **Introduction**

Platelets are blood cell fragments responsible for clotting and thrombus formation. Calcium signaling regulates the functional responses of platelets upon activation, including degranulation, integrin activation, procoagulant activity, initiation of the plasma coagulation cascade, and the synthesis and secretion of thromboxane A<sub>2</sub>, among others. X-linked agammaglobulinemia (XLA) is a genetic disorder characterized by impaired B-cell maturation and is also associated with abnormalities in calcium signaling. For instance, the lack of Bruton's tyrosine kinase (BTK) expression significantly reduces platelet aggregation and dense granule secretion in response to collagen activation in XLA patients.

Previously, we demonstrated that calcium responses in individual human platelets are heterogeneous. We identified four distinct types of calcium responses: (I) "no response", with rare single calcium spikes; (II) "weak response", featuring multiple calcium spikes without clustering; (III) "strong response", with multiple clustered spikes; and (IV) "persistently strong response", characterized by sustained high calcium levels leading to cell death. The aim of this study was to evaluate the heterogeneity of calcium responses in single platelets from XLA patients upon activation with ADP and thrombin, compared with healthy pediatric donors.

## **Materials and methods**

The study used whole venous blood from X-linked agammaglobulinemia patients and healthy pediatric donors (anticoagulated with hirudin). The heterogeneity of platelet calcium responses was assessed using fluorescence microscopy. Blood stained with the fluorescent probe CalBryte 590 was perfused through flow chambers coated with two types of adhesive substrates (type I collagen and anti-CD31 antibodies). Non-adhered cells were washed away with Tyrode's buffer, followed by imaging in the presence of activators (10  $\mu$ M ADP and 5 nM thrombin in Tyrode's buffer).

## **Results**

We demonstrated that under both collagen-coated and anti-CD31-coated conditions, calcium responses in platelets from XLA patients were attenuated across all activation types. Baseline activation (the contribution of the adhesive substrate in the absence of ADP and thrombin) was more significantly impaired compared to activation with ADP alone or with ADP and thrombin combined. Additionally, platelet adhesion in XLA patients was reduced compared to healthy donors.

## **Conclusions**

Thus, the lack of BTK expression weakens calcium responses in single platelets upon activation with ADP and thrombin and impairs their adhesion.

## **Acknowledgements**

PhD, prof., Sveshnikova A.N.

# **Полуколичественная оценка результатов иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови для пациентов с дефектами цитоскелета**

## ***Semi-quantitative assessment of the results of immunofluorescence staining of blood smears for patients with cytoskeletal defects***

Юшкова Е. В.<sup>1</sup>

Yushkova E. V.<sup>1</sup>

1. НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

1. FGBU "NMITS DGOI named after Dmitry Rogachev" Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Получено: 31.05.2025

Принято к публикации: 02.06.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: HMFVFNH

### **Введение**

Иммунофлуоресцентное окрашивание мазков крови — высокочувствительный метод, позволяющий выявлять структурные и молекулярные аномалии в клетках крови при различных заболеваниях. Синдром Вискотта-Олдрича — редкое X-сцепленное иммунодефицитное заболевание, характеризующееся тромбоцитопенией, экземой и повышенной восприимчивостью к инфекциям. Исследования показали, что при синдроме наблюдается дефект цитоскелета тромбоцитов, связанный с нарушением организации  $\beta$ 1-тубулина. Хронические миелопролиферативные заболевания (ХМПЗ) — группа клональных заболеваний костного мозга. Недавние исследования выявили аномальные включения немышечного миозина IIA в эритроцитах у части пациентов.

### **Материалы и методы**

Стандартные высушенные на воздухе мазки крови, забранной в пробирки с цитратом натрия, были зафиксированы в ледяном ацетоне (-20 °C). Мазки инкубировали с первичными антителами к немышечному миозину IIA типа/филамину и  $\beta$ 1-тубулину/GPIbIX и вторичными антителами, мечеными Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 647. Мазки крови оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии.

### **Результаты**

При сравнении доли деформированных тромбоцитов у пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича медиана 7,6% (IQR=3,6%-11,8%), а у здоровых доноров медиана 3,5% (IQR=1,4%-6,2%). Различия статистически значимы ( $p=0,011$ ). У 37,5% пациентов с ХМПЗ (12 из 32) в эритроцитах обнаружены скопления миозина IIA (медиана включений 16 на поле зрения, IQR=10–26), тогда как у здоровых доноров они отсутствуют.

### **Выводы**

Иммунофлуоресцентное окрашивание мазков крови выявило значимые структурные изменения в тромбоцитах при синдроме Вискотта-Олдрича ( $\beta$ 1-тубулин) и в эритроцитах при ХМПЗ (немышечный миозин IIA), что может служить дополнительным диагностическим критерием. Полученные данные подтверждают роль цитоскелетных нарушений в патогенезе этих заболеваний и требуют дальнейшего изучения.

### **Благодарности**

к. б. н., Подоплелова Н. А.

Грант РФФ 24-15-00387

## **Introduction**

Immunofluorescence staining of blood smears is a highly sensitive method for detecting structural and molecular abnormalities in blood cells in various diseases. Wiskott-Aldrich syndrome is a rare X-linked immunodeficiency disorder characterized by thrombocytopenia, eczema, and increased susceptibility to infections. Studies have shown that the syndrome has a defect in the platelet cytoskeleton associated with a violation of the organization of  $\beta$ 1-tubulin. Chronic myeloproliferative diseases (CMD) are a group of clonal diseases of the bone marrow. Recent studies have revealed abnormal inclusions of non-muscle myosin IIA in erythrocytes in some patients.

## **Materials and methods**

Standard air-dried blood smears made of blood, collected in tubes with sodium citrate, were fixed in ice acetone (-20 °C). The smears were incubated with primary antibodies to non-muscular myosin type IIA/ filamin and  $\beta$ 1-tubulin/GPIbIX and secondary antibodies labeled Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 647. Blood smears were evaluated using fluorescence microscopy.

## **Results**

When comparing the proportion of deformed platelets in patients with Wiskott-Aldrich syndrome, the median was 7.6% (IQR=3.6%-11.8%), and in healthy donors, the median was 3.5% (IQR=1.4%-6.2%). The differences are statistically significant ( $p=0.011$ ). In 37.5% of patients with CMD (12 out of 32), accumulations of myosin IIA were found in erythrocytes (median inclusions of 16 in the visual field, IQR=10-26), whereas they were absent in healthy donors.

## **Conclusions**

Immunofluorescence staining of blood smears revealed significant structural changes in platelets in Wiskott-Aldrich syndrome ( $\beta$ 1-tubulin) and in erythrocytes in CMD (non-muscular myosin IIA), which can serve as an additional diagnostic criterion. The data obtained confirm the role of cytoskeletal disorders in the pathogenesis of these diseases and require further study.

## **Acknowledgements**

PhD, Podoplelova N. A. Grant RNF 24-15-00387

# **Исследование активации тромбоцитов формами ферментативно-обработанного коллагена методом непрерывной проточной цитометрии**

## **Investigation of platelet activation by forms of enzymatically treated collagen by continuous flow cytometry**

Шпагина Е.В.<sup>1</sup>

Shragina E.V.<sup>1</sup>

1. Московский физико-технический институт, Москва, Россия

1. Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

Получено: 30.05.2025

Принято к публикации: 31.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: KXEUFJ

### **Введение**

Одним из ключевых механизмов в процессе тромбообразования является активация тромбоцитов через рецептор гликопротеин-VI (GPVI) при его взаимодействии с коллагеном. В методах изучения активации тромбоцитарного GPVI *in vitro* используется синтетический коллаген-подобный пептид (collagen-related peptide, CRP). Однако высокая стоимость и сложность синтеза CRP ограничивает его широкое применение. При этом доступные препараты коллагена не обеспечивают выраженной активации тромбоцитов. Целью работы является исследование активации тромбоцитов формами ферментативно обработанного коллагена.

### **Материалы и методы**

В исследовании изучалась активация тромбоцитов фибриллярным коллагеном I типа, ферментативно обработанным коллагеназой краба и коллагеназой Р. Активация тромбоцитов наблюдалась с помощью непрерывной проточной цитометрии. В качестве параметров активации тромбоцитов оценивались изменение концентрации внутриклеточного кальция, изменение формы тромбоцитов и выброс содержимого плотных гранул.

### **Результаты**

В эксперименте добавление фибриллярного коллагена к тромбоцитам не вызывало изменения концентрации внутриклеточного кальция, изменения формы тромбоцитов или выброса содержимого плотных гранул. Ферментативно обработанный коллагеназой краба и коллагеназой Р коллаген I типа вызывал мобилизацию кальция, изменение формы и выброс содержимого плотных гранул тромбоцитов. Однако, препарат коллагеназы краба без коллагена также вызывал кальциевый ответ тромбоцитов и выброс содержимого плотных гранул.

### **Выводы**

Ферментативная обработка коллагена I типа коллагеназой Р увеличивает его способность активировать тромбоциты. В то время использование коллагеназы краба осложняется вероятным наличием активирующих примесей. Полученные результаты подтверждают актуальность дальнейших исследований по использованию ферментативно-обработанного коллагена в качестве активатора тромбоцитов *in vitro*.

### **Благодарности**

д. ф-м н., профессор Свешникова А.Н.

## **Introduction**

One of the key mechanisms in the process of thrombosis is the activation of platelets through the glycoprotein-VI (GPVI) receptor during its interaction with collagen. Synthetic collagen-like peptide (CRP) is used in methods for studying platelet GPVI activation in vitro. However, the high cost and complexity of CRP synthesis limits its widespread use. At the same time, available collagen preparations do not provide pronounced platelet activation. The aim of the work is to study platelet activation by forms of enzymatically processed collagen.

## **Materials and methods**

The study investigated platelet activation by type I fibrillar collagen, enzymatically treated with crab collagenase and collagenase P. Platelet activation was observed using continuous flow cytometry. The parameters of platelet activation included changes in intracellular calcium concentration, changes in platelet shape, and the release of dense granules.

## **Results**

In the experiment, the addition of fibrillar collagen to platelets did not cause a change in the concentration of intracellular calcium, a change in the shape of platelets, or the release of the contents of dense granules. Type I collagen enzymatically treated with crab collagenase and collagenase P caused calcium mobilization, shape change, and release of the contents of dense platelet granules. However, the crab collagenase preparation without collagen also caused a platelet calcium response and the release of the contents of dense granules.

## **Conclusions**

Enzymatic treatment of type I collagen with collagenase P increases its ability to activate platelets. At that time, the use of crab collagenase is complicated by the likely presence of activating impurities. The results obtained confirm the relevance of further research on the use of enzymatically treated collagen as a platelet activator in vitro.

## **Acknowledgements**

PhD, Prof. Sveshnikova A.N.

# Роль фактора XIIIa в явлении агрегации тромбоцитов, индуцируемой опухолевыми клетками

## The role of factor XIIIa in the phenomenon of platelet aggregation induced by tumor cells

Корнейчук А.Д.<sup>1,2</sup>, Колесникова И. С.<sup>1</sup>, Мишуков А.А.<sup>1,2</sup>

Korneychuk A.D.<sup>1,2</sup>, Kolesnikova I. S.<sup>1</sup>, Mishukov A.A.<sup>1,2</sup>

1. ЦТГП ФХФ РАН, Москва, Россия

2. ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва, Россия

1. СТР PCP RAS, Moscow, Russia

2. FGBU "NMITS DGOI named after Dmitry Rogachev" Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Получено: 30.05.2025

Принято к публикации: 31.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: CUYATM

### Введение

Тромбоциты способны экранировать циркулирующие опухолевые клетки от иммунного ответа организма, способствуя гематогенному метастазированию некоторых солидных опухолей, однако, механизмы данного взаимодействия изучены не до конца. Данный процесс моделируется *in vitro* в феномене агрегации тромбоцитов, индуцируемой опухолевыми клетками. Для агрегации тромбоцитов в данных условиях необходимо присутствие плазмы крови, обеспечивающей окружение для развертывания каскада генерации тромбина по внешнему пути от тканевого фактора, который экспрессируется на поверхности опухолевых клеток. Ранее мы показали, что полимеризация фибрина играет ключевую роль в феномене агрегации тромбоцитов в присутствии опухолевых клеток. При этом сохранение нормальной функциональной активности тромбоцитов не является обязательным для их агрегации. Целью настоящего исследования являлось определение роли процесса образования поперечных сшивок между мономерами фибрина при участии фактора XIIIa в возникновении агрегации тромбоцитов, индуцированной опухолевыми клетками.

### Материалы и методы

Для исследования использовались отмытые тромбоциты здоровых взрослых доноров и опухолевые клетки линий MCF-7, MDA и SiHa. Для анализа агрегации тромбоцитов в присутствии опухолевых клеток (104 кл/мл) и свободной от тромбоцитов плазмы крови (1% v/v) использовался лазерный анализатор агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 (НПФ «Биола»), позволяющий наблюдать одновременно светорассеяние суспензии и размер агрегатов.

### Результаты

По результатам исследования присутствие T101, экспериментального ингибитора XIIIa, не вызвало значимых изменений ни во времени, ни в максимуме агрегации. Однако, постановки с дефицитной плазмой показали, что дефицит XIIIa фактора значимо влияет на наблюдаемый феномен, отсрочивая время начала агрегации. Помимо этого, была поставлена серия экспериментов, исследовавших влияние концентрации клеток, массовой доли плазмы и ряда терапевтических ингибиторов на агрегацию тромбоцитов в присутствии опухолевых клеток.

### Выводы

Образование поперечных сшивок между мономерами фибрина при участии фактора XIIIa способствует процессу агрегации тромбоцитов в присутствии опухолевых клеток, но не является обязательным.

### Благодарности

д.ф.-м.н. Свешникова А.Н. (научный руководитель)

## **Introduction**

Platelets are able to shield circulating tumor cells from the body's immune response, contributing to the hematogenous metastasis of some solid tumors, however, the mechanisms of this interaction have not been fully studied. This process is modeled in vitro in the phenomenon of platelet aggregation induced by tumor cells. Platelet aggregation under these conditions requires the presence of blood plasma, which provides an environment for the deployment of a cascade of thrombin generation along an external pathway from a tissue factor that is expressed on the surface of tumor cells. We have previously shown that fibrin polymerization plays a key role in the phenomenon of platelet aggregation in the presence of tumor cells. At the same time, maintaining the normal functional activity of platelets is not necessary for their aggregation. The purpose of this study was to determine the role of the formation of cross-links between fibrin monomers with the participation of factor XIIIa in the occurrence of platelet aggregation induced by tumor cells.

## **Materials and methods**

Washed platelets from healthy adult donors and tumor cells of the MCF-7, MDA and SiHa lines were used for the study. To analyze platelet aggregation in the presence of tumor cells (10<sup>4</sup> cells/ml) and platelet-free blood plasma (1% v/v), an ALAT-2 laser platelet aggregation analyzer (NPF Biola) was used, which allows simultaneous observation of the light scattering of the suspension and the size of the aggregates.

## **Results**

According to the results of the study, the presence of T101, an experimental inhibitor of XIIIa, did not cause significant changes either in time or in the maximum of aggregation. However, plasma deficiency studies have shown that factor XIIIa deficiency significantly affects the observed phenomenon, delaying the onset of aggregation. In addition, a series of experiments were conducted to investigate the effect of cell concentration, plasma mass fraction, and a number of therapeutic inhibitors on platelet aggregation in the presence of tumor cells.

## **Conclusions**

The formation of cross-links between fibrin monomers with the participation of factor XIIIa promotes the process of platelet aggregation in the presence of tumor cells, but is not mandatory.

## **Acknowledgements**

PhD Sveshnikova A.N. (scientific supervisor)

# Молекулярные механизмы влияния тромбоцитов на пролиферацию клеток

## *Molecular mechanisms of platelet influence on cell proliferation*

Колесникова И.С.<sup>1</sup>  
Kolesnikova I.S.<sup>1</sup>

1. ЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия

1. CTR PCP RAS, Moscow, Russia

Получено: 30.05.2025

Принято к публикации: 31.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: CPCHVO

### Введение

Традиционно, основная функция тромбоцитов — участие в гемостазе и тромбозе в следствии их взаимодействия с основными активаторами в последствии сосудистого повреждения. Тем не менее, все больше данных свидетельствуют о том, что тромбоциты могут выполнять множество других функций. Активированные тромбоциты могут секретировать высокую концентрацию фибрина, цитокинов, хемокинов интегрнов, селектинов, факторов роста, таких как трансформирующий фактор роста бета (TGFβ), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и тромбоцитарный фактор роста (PDGF), которые способствуют перестройке ВКМ вследствие экспрессии MMPs, прометастатическим процессам, таким как эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) и ангиогенез.

### Материалы и методы

Основными методами детекции пролиферации культуры клеток рака молочной железы MCF-7, является scratch test и микроскопия фазового контраста, которые позволяют идентифицировать основные изменения в пролиферации культур клеток, их подвижность, а также изменение морфологии вследствие покраски клеток по Гимзе-Романовскому, в присутствии тромбоконцентратов полученных различными активаторами агрегации тромбоцитов: ADP, THR, collagen I (III) типа, CaCl<sub>2</sub>. В качестве контроля использовали среды не содержащие сыворотки или же среду с FBS.

### Результаты

При наблюдении за зарастанием царапины в присутствии тромбоконцентратов на протяжении 16 часов, основным отличием от контроля было уменьшение адгезии части клеток, которое выражалось в частичном откреплении распластанных клеток, либо полном откреплении от поверхности стекла спустя 5-10 часов. При этом скорость пролиферации до момента “ошаривания” практически не отличалась от FBS.

### Выводы

Изменение адгезии клеточных культур может быть следствием одного либо нескольких процессов, обусловленных наличием в тромбоконцентратах высокой концентрации биологически активных веществ, которые могут способствовать, как апоптозу клеток, так и деградации ВКМ, EMT-переходу, и другим механизмам.

### Благодарности

д.ф.-м.н., зав. лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии ЦТП ФХФ РАН Свешникова А.Н.)

## **Introduction**

Traditionally, the main function of platelets is to participate in hemostasis and thrombosis as a result of their interaction with the main activators in the case of vascular damage. However, more and more evidence suggests that platelets can perform many other functions. Activated platelets can secrete high concentrations of fibrin, cytokines, integrin chemokines, selectins, and growth factors such as transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ), vascular endothelial growth factor (VEGF), and platelet-derived growth factor (PDGF), which contribute to ICM restructuring due to MMPs expression, prometastatic processes such as epithelial-mesenchymal transition (EMT) and angiogenesis.

## **Materials and methods**

The main methods for detecting proliferation of MCF-7 breast cancer cell cultures are scratch test and phase contrast microscopy, which make it possible to identify the main changes in cell culture proliferation, their mobility, as well as morphological changes due to Giemse-Romanovsky cell staining in the presence of platelet concentrates obtained by various platelet aggregation activators: ADP, THR, collagen type I(III) , CaCl<sub>2</sub>. Medium without serum or medium with FBS were used as a control.

## **Results**

When observing the overgrowth of a scratch in the presence of thromboconcentrates for 16 hours, the main difference from the control was a decrease in the adhesion of some cells, which was expressed in partial detachment of the spread cells, or complete detachment from the glass surface after 5-10 hours. At the same time, the rate of proliferation up to the moment of "scalding" practically did not differ from FBS.

## **Conclusions**

Changes in cell culture adhesion may be the result of one or more processes caused by the presence of high concentrations of biologically active substances in thromboconcentrates, which can contribute to both cell apoptosis and degradation of ICM, EMT transition, and other mechanisms.

## **Acknowledgements**

PhD, Head of Laboratories of Intracellular Signaling and Systems Biology of the Central Research Institute of the Russian Academy of Sciences Sveshnikova A.N.

# Анализ функциональной активности тромбоцитов с помощью проточной цитометрии на модели рака EMT-6

## Flow cytometry analysis of platelet functional activity in EMT-6 model of cancer

Гаур Самридхи<sup>1</sup>  
Gaur Samridhi<sup>1</sup>

1. МФТИ, Москва, Россия  
1. MIPT, Moscow, Russia

Получено: 30.05.2025  
EDN: TLGBZI

Принято к публикации: 31.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

### Введение

Тромбоциты и опухоли взаимодействуют двунаправленно. Тромбоциты являются эффекторами опухолевой пролиферации, в то время как влияние опухоли на активность тромбоцитов остается малоизученным. Изучение влияния опухолей на функциональную активность тромбоцитов может открыть новые возможности для инновационных методов лечения такого смертельного заболевания, как рак. Основной целью этого исследования является понимание влияния солидной опухоли на тромбоциты.

### Материалы и методы

В данной работе мы разработали тесты функциональной активности тромбоцитов с помощью проточной цитометрии и оценили изменения состояния тромбоцитов в модели метастатического рака молочной железы EMT-6 *in vivo*. Использовались непрерывная и конечная точки проточной цитометрии.

### Результаты

Количественный выход тромбоцитов после выделения у мышей с опухолью был значительно ( $P < 0,01$ ) ниже по сравнению со здоровыми мышами. Кроме того, такие реакции, как изменение формы и прокоагулянтная активность, у мышей с опухолью EMT-6 значительно ниже, чем у здоровых мышей. Напротив, мобилизация кальция значительно выше в тромбоцитах мышей с опухолью EMT-6 по сравнению со здоровыми мышами.

### Выводы

Результаты конечной точки и непрерывной проточной цитометрии показывают снижение выхода тромбоцитов при выделении от мышей с опухолью EMT-6, нарушение функциональных реакций на активацию: прокоагулянтную активность, мобилизацию кальция и изменение формы. Таким образом, развитие рака молочной железы у мышей, вероятно, вызывает повышенный оборот тромбоцитов и умеренную невосприимчивость тромбоцитов к активации или опосредованному опухолью повреждению тромбоцитов.

### Благодарности

д.ф.-м.н., зав. лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии ЦТП ФХФ РАН Свешникова А.Н.)

## **Introduction**

Platelets and tumors both communicate bidirectionally. Platelets are effectors of tumor proliferation, whereas impact of tumor on platelet activity remains poorly investigated. Studying the effect of tumors on platelets functional activity which is generated upon activation might open new avenues for innovative therapies for treating the deadly disease like cancer. The main focus of this research is to understand the impact of solid tumor on platelets.

## **Materials and methods**

In this work, we developed flow cytometry platelet functional activity tests and evaluated changes in platelet status in an in vivo model of metastatic breast cancer EMT-6. Continuous and endpoint flow cytometry were used.

## **Results**

The quantitative yield of platelets after isolation from tumor-bearing mice was significantly ( $P < 0.01$ ) lower compared to healthy mice. Additionally, responses like shape change and procoagulant activity in EMT-6 tumor-bearing mice is significantly lower than in healthy mice. On the contrary, Calcium mobilization is significantly higher in platelets from EMT-6 tumor bearing mice in comparison to healthy mice.

## **Conclusions**

The results of endpoint and continuous flow cytometry show lower platelets yield during isolation from EMT-6 tumor-bearing mice, impaired functional responses to activation: procoagulant activity, calcium mobilisation and shape change. Thus, the development of breast cancer in mice probably induces increased platelet turnover and mild platelet refractoriness to activation or tumor-mediated platelet damage.

## **Acknowledgements**

PhD, Head of Laboratories of Intracellular Signaling and Systems Biology of the Central Research Institute of the Russian Academy of Sciences Sveshnikova A.N.

# **Механизмы агрегации тромбоцитов в присутствии опухолевых клеток**

## **Mechanisms of platelet aggregation in the presence of tumor cells**

Васильев Г.А.<sup>1</sup>  
Vasiliev G.A.<sup>1</sup>

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии. Российской академии наук, Москва, Россия
1. Center for Theoretical Problems of Physico-chemical Pharmacology. Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Получено: 31.05.2025  
EDN: MWSJZR

Принято к публикации: 02.06.2025

Опубликовано: 30.07.2025

### **Введение**

Основная задача тромбоцитов – безъядерных клеток крови – состоит в образовании устойчивого агрегата в месте повреждения стенки сосуда. Известен феномен агрегации тромбоцитов в ответ на небольшое (на 2 порядка меньше) добавление опухолевых клеток. Тромбоциты обеспечивают защиту опухолевых клеток от иммунной системы, тем самым способствуя метастазированию. Определение механизмов агрегации тромбоцитов в присутствии опухолевых клеток потенциально имеет практическое применение в терапии. Целью данной работы является определение возможных механизмов агрегации тромбоцитов в присутствии опухолевых клеток.

### **Материалы и методы**

Ввиду неприменимости непрерывных приближений в описании феномена в качестве методов выбрано компьютерное моделирование на основе клеточных автоматов. В рамках модели для сетки задано начальное распределение ячеек по дискретным состояниям. С каждым шагом по времени изменяют свои состояния по правилам (диффузия, активация, агрегация и пр.).

### **Результаты**

В результате выполнения работы получены следующие результаты. Модель способна к качественному воспроизведению основных характерных черт данных агрегометрии, получаемых в эксперименте. В конфигурации без гидродинамического потока установлено, что конечное распределение клеток по состояниям является результатом конкуренции между процессами образования и распада агрегатов и зависит от вероятностей этих процессов. При добавлении потока в модель агрегаты малых размеров (1-3 тромбоцита) составляют большинство в конечном распределении.

### **Выводы**

Определён возможный механизм — агрегации тромбоцитов в присутствии опухолевых клеток — агрегация путём взаимодействия с быстро диффундирующим активатором, выделяемой опухолевой клеткой. Дальнейшие исследования в данном направлении могут касаться уточнения механизмов агрегации тромбоцитов, в частности, определения роли внеклеточных везикул в данном процессе.

## **Introduction**

The main task of platelets, non–nuclear blood cells, is to form a stable aggregate at the site of damage to the vessel wall. The phenomenon of platelet aggregation is known in response to a small (2 orders of magnitude smaller) addition of tumor cells. Platelets protect tumor cells from the immune system, thereby contributing to metastasis. Determining the mechanisms of platelet aggregation in the presence of tumor cells has potential practical applications in therapy. The purpose of this work is to determine the possible mechanisms of platelet aggregation in the presence of tumor cells.

## **Materials and methods**

Due to the inapplicability of continuous approximations in the description of the phenomenon, computer modeling based on cellular automats was chosen as a method. Within the framework of the model, the initial distribution of cells over discrete states is set for the grid. With each time step, they change their states according to the rules (diffusion, activation, aggregation, etc.).

## **Results**

The following results were obtained. The model is capable of high-quality reproduction of the main characteristic features of the aggregometry data obtained in the experiment. In the configuration without hydrodynamic flow, it was found that the final distribution of cells by states is the result of competition between the processes of formation and disintegration of aggregates and depends on the probabilities of these processes. When adding the flow to the model, small aggregates (1-3 platelets) make up the majority of the final distribution.

## **Conclusions**

A possible mechanism of platelet aggregation in the presence of tumor cells has been identified: aggregation by interaction with a rapidly diffusing activator secreted by the tumor cell. Further research in this area may concern clarifying the mechanisms of platelet aggregation, in particular, determining the role of extracellular vesicles in this process.

# **Иммунофлуоресцентный метод исследования внеклеточных ДНК-ловушек нейтрофилов на мазках плазмы крови**

## **An immunofluorescence method for studying extracellular DNA traps of neutrophils on blood plasma smears**

Адаманская Е.И.А.<sup>1,2</sup>

Adamanskaya E.I.A.<sup>1,2</sup>

1. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

2. НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

1. Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

2. FGBU "NMITS DGOI named after Dmitry Rogachev" Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Получено: 23.05.2025

Принято к публикации: 30.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: APWKRG

### **Введение**

Нейтрофилы — ключевые клетки врожденного иммунитета. Помимо фагоцитоза и дегрануляции важным механизмом их активности является выброс структур, состоящих из расплетенного хроматина и антимикробных ферментов. Такие структуры называются NET-ами. NET-оз играет двойственную роль: с одной стороны, NET-ы уничтожают патогены, с другой — их избыточное образование способствует хроническому воспалению, аутоиммунным и тромботическим осложнениям. При онкологических заболеваниях, включая рак молочной железы (РМЖ), наблюдается повышенный уровень NET-оза, что может влиять на прогрессирование болезни.

### **Материалы и методы**

Исследование проводилось на мазках плазмы, обогащённой лейкоцитами (ПБЛ), от здоровых доноров и онкологических пациентов. Образцы фиксировали 1-2% формалином (7-30 мин), блокировали 1% BSA и промывали PBS. Для иммунофлуоресцентного анализа использовали антитела к миелопероксидазе и нейтрофильной эластазе (первичные), а также флуоресцентно-меченые вторичные антитела (anti-Mouse AF488, anti-Rabbit AF568). ДНК визуализировали красителем Hoechst33342. Анализ выполняли на конфокальном микроскопе Ti2-E.

### **Результаты**

Отработана методика исследования уровня NET-оза на ПБЛ и подобраны оптимальные условия получения плазмы и фиксации. Этот подход обеспечивает специфичность и чувствительность при оценке NET-оза, и позволяет количественно и качественно анализировать образование этих структур. Базовый уровень образования ДНК ловушек нейтрофилов не превышал 9 %. У пациентов с раком молочной железы до терапии уровень NET-оза оказался выше (медиана 22,9%), чем у здоровых. В тоже время у пациентов с ТН РМЖ медиана оказалась равной 7,2% [2,6; 17,5].

### **Выводы**

Разработанная методика позволяет изучить NET-оз на мазках плазмы крови, что важно для понимания его роли в патогенезе некоторых заболеваний, а также оценить функциональную активность нейтрофилов. У пациентов с раком молочной железы выявлена повышенная склонность нейтрофилов к образованию NET-ов, что может быть связано с прогрессированием болезни.

### **Благодарности**

д.ф.-м.н, проф., Свешникова А.Н.

Работа поддержана грантом РФФ 23-45-10039

## **Introduction**

Neutrophils are key cells of the innate immune system. In addition to phagocytosis and degranulation, an important mechanism of their activity is the release of structures consisting of unwound chromatin and antimicrobial enzymes. Such structures are called nets. NET-osis plays a dual role: on the one hand, NET-s destroy pathogens, on the other — their excessive formation contributes to chronic inflammation, autoimmune and thrombotic complications. In oncological diseases, including breast cancer (BC), there is an increased level of NET-osis, which can affect the progression of the disease.

## **Materials and methods**

The study was conducted on smears of plasma enriched with leukocytes (PBL) from healthy donors and cancer patients. The samples were fixed with 1-2% formalin (7-30 min), blocked with 1% BSA, and washed with PBS. For immunofluorescence analysis, antibodies to myeloperoxidase and neutrophil elastase (primary), as well as fluorescently labeled secondary antibodies (anti-Mouse AF488, anti-Rabbit AF568) were used. DNA was visualized with Hoechst33342 dye. The analysis was performed on a Ti2-E confocal microscope.

## **Results**

A methodology for studying the level of NET-osis on PBL has been developed and optimal conditions for plasma production and fixation have been selected. This approach provides specificity and sensitivity in the assessment of NET-osis, and allows quantitative and qualitative analysis of the formation of these structures. The baseline level of neutrophil trap DNA formation did not exceed 9%. In patients with breast cancer before therapy, the level of NET-osis was higher (median 22.9%) than in healthy subjects. At the same time, in patients with breast cancer, the median was 7.2% [2.6; 17.5].

## **Conclusions**

The developed technique makes it possible to study NET-osis on blood plasma smears, which is important for understanding its role in the pathogenesis of certain diseases, as well as to evaluate the functional activity of neutrophils. Patients with breast cancer have an increased tendency of neutrophils to form nets, which may be associated with the progression of the disease.

## **Acknowledgements**

PhD, prof., Sveshnikova A.N.

The work was supported by the Russian Science Foundation grant 23-45-10039

# **Влияние продуктов на основе сшитой гиалуроновой кислоты на фибробласты кожи человека: их морфологию, пролиферацию, старение и митохондриальный биогенез**

## **The effect of products based on crosslinked hyaluronic acid on human skin fibroblasts: their morphology, proliferation, aging, and mitochondrial biogenesis**

Ивановская Е. В.<sup>1,2</sup>

Ivanovskaya E. V.<sup>1,2</sup>

1. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

2. Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

1. Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

2. D.I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology, Moscow, Russia

Получено: 30.05.2025

Принято к публикации: 31.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

EDN: XROXCI

### **Введение**

В настоящее время в эстетической медицине широко применяются препараты на основе сшитой гиалуроновой кислоты. Основные механизмы влияния чистого соединения на клетки, а также его синтез и биодеградация в межклеточном матриксе уже исследованы. Результаты данной работы направлены на понимание влияния продуктов на основе высокомолекулярной гиалуроновой кислоты, сшитой дивинилсульфоном, на клеточную морфологию, пролиферацию, старение и митохондриальный биогенез.

### **Материалы и методы**

Работа проводилась на клеточной культуре молодых и стареющих фибробластов кожи человека. Культура велась при стандартных условиях в полной среде ДМЕМ. Для исследования влияния продукта на основе высокомолекулярной гиалуроновой кислоты, сшитой дивинилсульфоном, готовились растворы полной среды различной объемной концентрации. Для оценки морфологии, пролиферации и старении клеток проводилось окрашивание по Гимзе-Романовскому, световая микроскопия и обученная программа для подсчета клеток. Для исследования митохондриального биогенеза применялись методы проточной цитометрии и конфокальной микроскопии с использованием красителя Mitotrack red.

### **Результаты**

В результате исследования влияния на фибробласты кожи человека было выявлено, что продукты на основе гиалуроновой кислоты стимулируют пролиферацию даже в объемной концентрации 1 %. Увеличение количества клеток наблюдается, как у молодых фибробластов, так и у фиброцитов. Морфология при этом на ранних пассажах не меняется, а на стареющих заметен эффект «омоложения» культуры. По данным литературных источников подобный эффект создается и чистой гиалуроновой кислотой путем увеличения экспрессии белков PGC-1 $\alpha$  и mTFA, которые напрямую влияют на митохондриальный биогенез. Поэтому экспериментально была выявлена зависимость концентрации продукта на митохондриальную массу клеток.

### **Выводы**

Продукты на основе сшитой высокомолекулярной гиалуроновой кислоты оказывают влияние на пролиферацию молодых и старых фибробластов и приводят к эффекту «омоложения» последних. Также продукты приводят к увеличению митохондриальной массы клеток.

### **Благодарности**

д.ф.-м.н., зав. лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии ЦТП ФХФ РАН, Свешникова А.Н.

## **Introduction**

Currently, crosslinked hyaluronic acid preparations are widely used in aesthetic medicine. The main mechanisms of the effect of the pure compound on cells, as well as its synthesis and biodegradation in the intercellular matrix have already been investigated. The results of this work are aimed at understanding the effect of products based on high-molecular hyaluronic acid crosslinked with divinylsulfone on cellular morphology, proliferation, aging, and mitochondrial biogenesis.

## **Materials and methods**

The work was carried out on a cell culture of young and aging human skin fibroblasts. The culture was conducted under standard conditions in a complete DMEM environment. To study the effect of a product based on high molecular weight hyaluronic acid crosslinked with divinylsulfone, solutions of a complete medium of various volume concentrations were prepared. To assess the morphology, proliferation, and aging of cells, Giemse-Romanovsky staining, light microscopy, and a trained cell counting program were performed. The methods of flow cytometry and confocal microscopy using Mitotrack red dye were used to study mitochondrial biogenesis.

## **Results**

As a result of a study of the effect on human skin fibroblasts, it was found that products based on hyaluronic acid stimulate proliferation even at a volume concentration of 1%. An increase in the number of cells is observed in both young fibroblasts and fibrocytes. At the same time, the morphology does not change in the early passages, and the effect of “rejuvenation” of the culture is noticeable in the aging ones. According to literature sources, a similar effect is created by pure hyaluronic acid by increasing the expression of PGC-1 $\alpha$  and mTFA proteins, which directly affect mitochondrial biogenesis. Therefore, experimentally, the dependence of the product concentration on the mitochondrial mass of cells was revealed.

## **Conclusions**

Products based on crosslinked high molecular weight hyaluronic acid have an effect on the proliferation of young and old fibroblasts and lead to the effect of “rejuvenation” of the latter. The products also lead to an increase in the mitochondrial mass of cells.

## **Acknowledgements**

PhD, Head of Laboratories of Intracellular Signaling and Systems Biology of the Central Research Institute of the Russian Academy of Sciences, Sveshnikova A.N.

# **Различные эффекты терапии агонистами рецепторов тромбopoэтина на тромбоциты при синдроме Вискотта-Олдрича**

## **Various effects of thrombopoietin receptor agonist therapy on platelets in Wiskott-Aldrich syndrome**

Тараканова А.А.<sup>1</sup>, Галкина С.В.<sup>1,2</sup>  
Tarakanova A.A.<sup>1</sup>, Galkina S.V.<sup>1,2</sup>

1. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия
2. Национальный научный центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

1. Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
2. National Scientific Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Moscow, Russia

Получено: 30.05.2025  
EDN: FHEAIK

Принято к публикации: 31.05.2025

Опубликовано: 30.07.2025

### **Введение**

Основным средством коррекции геморрагического состояния при синдроме Вискотта-Олдрича (WAS) является группа агонистов рецептора с-Mpl тромбopoэтина (TPOr). Двумя основными используемыми агонистами TPOr являются Элтромбопаг и Ромиплостим. Элтромбопаг непосредственно активирует TPOr, Ромиплостим конкурирует с TPO за TPOr. Основным терапевтическим эффектом данных препаратов является увеличение количества тромбоцитов. Влияние на функциональность тромбоцитов остается неясным.

### **Материалы и методы**

В исследование были включены 10 здоровых детей-доноров и 30 детей-пациентов с WAS (19 – Ромиплостим, 5 - Элтромбопаг, 6 - без терапии). Для оценки кальциевой сигнализации тромбоцитов и функциональных реакций были использованы непрерывная проточная цитометрия и TIRF-микроскопия.

### **Результаты**

Анализ с помощью проточной цитометрии показал, что размер тромбоцитов остался уменьшенным у всех пациентов с WAS. В ответ на активацию с помощью ADP или SFLLRN изменение формы были заметно снижены у всех пациентов. Интересно, что в ответ на активацию CRP наблюдалось значительное снижение всех показателей активации (мобилизация кальция, изменение формы, связывание фибриногена). Однако все перечисленные наблюдения не зависели от терапии. Кальциевая сигнализация в единичных тромбоцитах, иммобилизованных на коллагене, показала снижение реакции у пациентов, получавших ромиплостим, по сравнению с другими группами.

### **Выводы**

Кальциевая сигнализация тромбоцитов и изменение их формы в ответ на активацию заметно снижены при WAS. Наиболее значимая разница наблюдалась в ответ на активацию рецептора GPVI с помощью CRP. Как элтромбопаг, так и ромиплостим не влияют на изменение реакции тромбоцитов при WAS.

### **Благодарности**

д.ф.-м.н., зав. лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии ЦТП ФХФ РАН, Свешникова А.Н.

## **Introduction**

The main therapy for hemorrhagic condition in Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is a group of thrombopoietin c-Mpl receptor agonists (TPOr). The two most widely used TPOr agonists are Eltrombopag and Romiplostim. Eltrombopag directly activates TPOr, Romiplostim competes with TPO for TPOr. The main therapeutic effect of these drugs is an increase in the number of platelets. The effect on platelet function remains unclear.

## **Materials and methods**

The study included 10 healthy pediatric donors and 30 patients with WAS (19 – Romiplostim, 5 – Eltrombopag, 6 - without therapy). Continuous flow cytometry and TIRF microscopy were used to evaluate platelet calcium signaling and functional reactions.

## **Results**

Analysis by flow cytometry showed that platelet size remained reduced in all patients with WAS. In response to activation with ADP or SFLLRN, shape changes were markedly reduced in all patients. Interestingly, in response to CRP activation, there was a significant decrease in all activation parameters (calcium mobilization, shape change, fibrinogen binding). However, all of these observations were independent of therapy. Calcium signaling in single platelets immobilized on collagen showed a decrease in response in patients treated with romiplostim, compared with other groups.

## **Conclusions**

Platelet calcium signaling and shape changes in response to activation are markedly reduced in WAS. The most significant difference was observed in response to activation of the GPVI receptor by CRP. Both eltrombopag and romiplostim do not affect the change in platelet response in WAS.

## **Acknowledgements**

PhD, Head of Laboratories of Intracellular Signaling and Systems Biology of the Central Research Institute of the Russian Academy of Sciences, Sveshnikova A.N.