

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ЦЕНТР ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИИ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ЦТП ФХФ РАН)

УДК 577.3.01 577.38 577.3:51-76

Per. № НИОКТР АААА-А18-118012390247-0

Per. № НИОКТР АААА-А18-118012390250-0

Per. № ИКРБС



УТВЕРЖДАЮ

ВРИО директора ЦТП ФХФ РАН

д-р физ.-мат. наук, член-корр. РАН, проф. РАН

М.А. Пантелеев

« 20 » 2020 г.

М.П.

Отчет

о научно-исследовательской работе

В рамках Программы фундаментальных научных исследований  
государственных академий наук на 2013-2020 годы

ИЗУЧЕНИЕ БИОФИЗИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ  
ДВИЖЕНИЯ ХРОСОМ В ПРОЦЕССАХ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК,  
ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ, РАЗРАБОТКА НОВЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ  
НАРУШЕНИЙ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И СОЗДАНИЕ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ  
ПЛАЗМОЗАМЕЩАЮЩИХ ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩИХ СРЕДСТВ  
И

ВЫЯВЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ,  
ОБРАЗА ЖИЗНИ И ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ  
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ВОЗНИКНОВЕНИЮ МУЛЬТИФАКТОРНЫХ  
ЗАБОЛЕВАНИЙ КАК ОСНОВА ПРЕДИКТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Руководитель НИР,  
Научный руководитель ЦТП ФХФ РАН,  
гл. науч.сотр.  
д-р. биол. наук, проф., член-корр. РАН

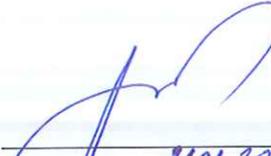
подпись, дата

Ф.И. Атауллаханов

Москва 2019

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР,  
 Научный руководитель ЦТП ФХФ  
 РАН, гл. науч. сотр., д-р.биол.наук,  
 член-корр. РАН

  
 21.01.20  
 подпись, дата

Ф. И. Атауллаханов  
 (введение, заключение)

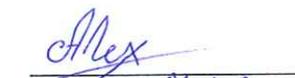
Отв. исполнитель  
 ВРИО директора ЦТП ФХФ РАН,  
 зав. лаб., д-р. физ.-мат. наук,  
 профессор РАН, член-корр. РАН

  
 21.01.20  
 подпись, дата

М.А. Пантелеев  
 (введение, заключение,  
 раздел 1.1,  
 нормоконтроль)

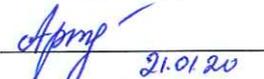
Исполнители:

Стажер-исследователь

  
 21.01.20  
 подпись, дата

В.В. Александрова  
 (раздел 1.2)

Научный сотрудник, канд. биол.  
 наук

  
 21.01.20  
 подпись, дата

Е.О. Артеменко  
 (раздел 1.1)

Мл. науч. сотр.

  
 21.01.20  
 подпись, дата

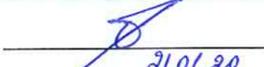
А.Е. Асадов  
 (раздел 1.1)

Мл. науч. сотр.

  
 21.01.20  
 подпись, дата

Ф.А. Балабин  
 (раздел 1.1)

Зам. директора по научной работе,  
 зав. лабораторией, канд. биол. наук

  
 21.01.20  
 подпись, дата

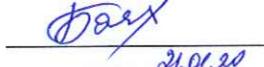
А.Н. Баландина  
 (раздел 1.1)

Мл. науч. сотр.

  
 21.01.20  
 подпись, дата

Е.А. Береснева  
 (раздел 1.1)

Мл. науч. сотр.

  
 21.01.20  
 подпись, дата

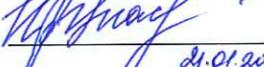
А.В. Бояхчян  
 (раздел 1.2)

Мл. науч. сотр.

  
 21.01.20  
 подпись, дата

Д.С. Виноградов  
 (раздел 1.2)

Ст. науч. сотр., канд. биол. наук

  
 21.01.20  
 подпись, дата

И.М. Власова  
 (раздел 1.1)

Инженер-исследователь

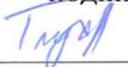
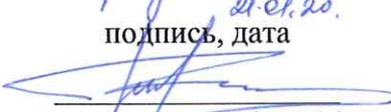
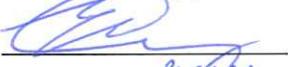
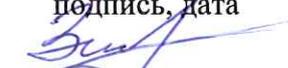
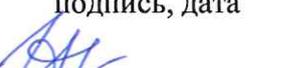
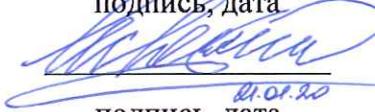
  
 21.01.20  
 подпись, дата

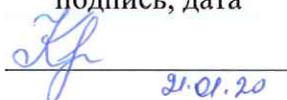
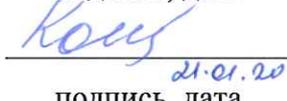
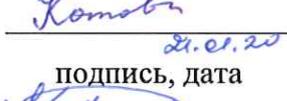
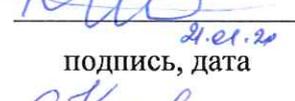
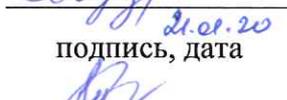
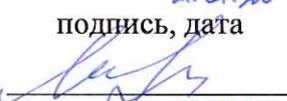
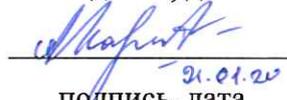
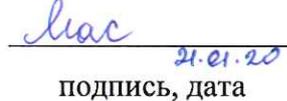
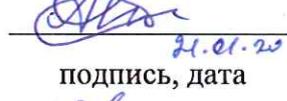
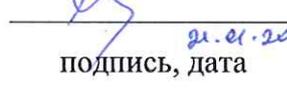
В.А. Волков  
 (раздел 1.2)

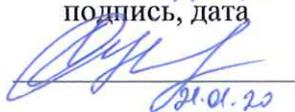
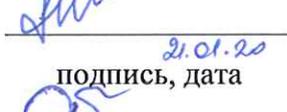
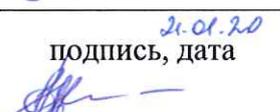
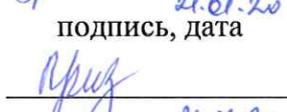
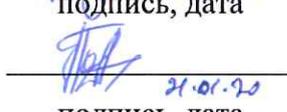
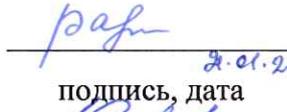
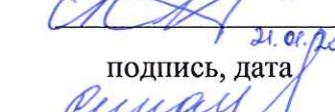
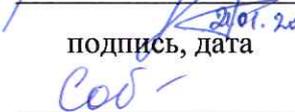
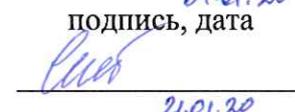
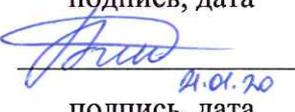
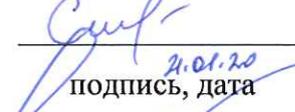
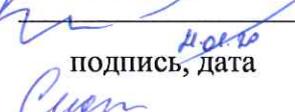
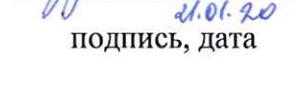
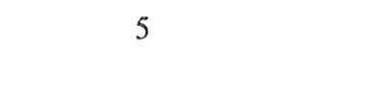
Гл. науч. сотр., докт. мед. наук

  
 21.01.20  
 подпись, дата

А.И. Воробьев  
 (раздел 2.1)

Вед. науч. сотр., канд. биол. наук	 подпись, дата 21.01.20	Т.А. Вуймо (раздел 1.1)
Науч. сотр.	 подпись, дата 21.01.20	А.А. Глухова (раздел 1.1)
Мл. науч. сотр.	 подпись, дата 21.01.20	И.В. Гончар (раздел 1.1)
Техник	 подпись, дата 21.01.20	С.М. Григорьев (раздел 1.1)
Зав. лабораторией, канд. физ.-мат. наук	 подпись, дата 21.01.20	Н.Б. Гудимчук (раздел 1.2)
Ведущий инженер	 подпись, дата 21.01.20	А.Д. Даниелян (раздел 2.2)
Вед. науч. сотр., докт. мед. наук	 подпись, дата 21.01.20	Е.В. Дворянкова (раздел 2.4)
Мл. науч. сотр.	 подпись, дата 21.01.20	В.М. Демидов (раздел 1.2)
Ст. науч. сотр., канд. мед. наук	 подпись, дата 21.01.20	Е.В. Денисова (раздел 2.4)
Техник	 подпись, дата 21.01.20	С.А. Дорофеев (раздел 1.1)
Заведующий группой, канд. биол. наук	 подпись, дата 21.01.20	А.В. Зайцев (раздел 1.2)
Ведущий программист	 подпись, дата 21.01.20	А.В. Иванов (раздел 1.1)
Зав. лабораторией, докт. мед. наук	 подпись, дата 21.01.20	И.Д. Ионов (раздел 2.3)
Ст. науч. сотр., канд. физ.-мат. наук	 подпись, дата 21.01.20	И.Л. Канев (раздел 1.2)
Заведующий отделом, канд. биол. наук	 подпись, дата 21.01.20	С.С. Карамзин (раздел 1.1)
Мл. науч. сотр.	 подпись, дата 21.01.20	Р.Р. Керимов (раздел 1.1)
Мл. науч. сотр.	 подпись, дата 21.01.20	Т.А. Коваленко (раздел 1.1)

Ученый секретарь, канд. биол. наук	 21.01.20 подпись, дата	Е.М. Кольцова (раздел 1.1)
Мл. науч. сотр.	 21.01.20 подпись, дата	Ю. Д. Коробкина (раздел 1.1)
Ведущий инженер-технолог	 21.01.20 подпись, дата	Н.Г. Коротина (раздел 1.1)
Зав. лабораторией, докт. мед. наук	 21.01.20 подпись, дата	И.М. Корсунская (раздел 2.4)
Ст. науч. сотр., канд. биол. наук	 21.01.20 подпись, дата	А.В. Коршунова (раздел 1.2)
Ст. науч. сотр., канд. биол. наук	 21.01.20 подпись, дата	Я.Н. Котова (раздел 1.1)
Ст. науч. сотр., канд. биол. наук	 21.01.20 подпись, дата	О.С. Кременецкая (раздел 2.1)
Ст. науч. сотр., канд. физ.-мат. наук	 21.01.20 подпись, дата	С.А. Кузнецова (раздел 2.1)
Науч. сотр.	 21.01.20 подпись, дата	А.Д. Купраш (раздел 1.1)
Ст. науч. сотр., канд. биол. наук	 21.01.20 подпись, дата	Е.Н. Липец (раздел 1.1)
Науч. сотр.	 21.01.20 подпись, дата	Ю.И. Мазничка (раздел 2.3)
Мл. науч. сотр.	 21.01.20 подпись, дата	А.С. Майоров (раздел 1.2)
Вед. науч.сотр., канд. физ-мат. наук	 21.01.20 подпись, дата	М.В. Мартынов (раздел 2.2)
Мл. науч. сотр.	 21.01.20 подпись, дата	А.А. Мартъянов (раздел 1.1)
Стажер-исследователь	 21.01.20 подпись, дата	А.А. Масальцева (раздел 1.1)
Стажер-исследователь	 21.01.20 подпись, дата	А.Д. Мегалинский (раздел 1.1)
Мл. науч. сотр.	 21.01.20 подпись, дата	Д.Р. Мильдзихова (раздел 2.4)

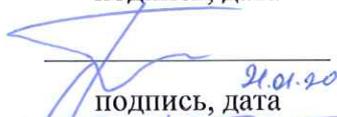
Науч. сотр.	 _____ 21.01.20 подпись, дата	В.В. Мустяца (раздел 1.2)
Инженер-исследователь	 _____ 21.01.20 подпись, дата	Ю.И. Наумов (раздел 2.3)
Науч. сотр., канд. физ.-мат. наук	 _____ 21.01.20 подпись, дата	Д.Ю. Нечипуренко (раздел 1.1)
Гл. науч. сотр., докт. мед. наук	 _____ 21.01.20 подпись, дата	И.С. Николаева (раздел 2.3)
Мл. науч. сотр.	 _____ 21.01.20 подпись, дата	С.И. Обыденный (раздел 1.1)
Мл. науч. сотр.	 _____ 21.01.20 подпись, дата	Н.А. Петрунина (раздел 1.1)
Гл. науч. сотр., докт. мед. наук	 _____ 21.01.20 подпись, дата	А.Л. Пирузян (раздел 2.4)
Ст. науч. сотр., канд. биол. наук	 _____ 21.01.20 подпись, дата	Н.А. Подоплелова (раздел 1.1)
Гл. науч. сотр., докт. биол. наук	 _____ 21.01.20 подпись, дата	Л.А. Радкевич (раздел 2.3)
Зав. лабораторией, канд. физ.-мат. наук	 _____ 21.01.20 подпись, дата	А.Н. Свешникова (раздел 1.1)
Зав. лабораторией, д-р. биол. наук	 _____ 21.01.20 подпись, дата	Е.И. Синауридзе (раздел 2.2)
Ст. науч. сотрудник, канд. биол. наук	 _____ 21.01.20 подпись, дата	В.В. Соболев (раздел 2.4)
Науч. сотрудник, канд. биол. наук	 _____ 21.01.20 подпись, дата	А.Г. Соболева (раздел 2.4)
Мл. науч. сотр.	 _____ 21.01.20 подпись, дата	П.А. Соловьева (раздел 1.1)
Стажер-исследователь	 _____ 21.01.20 подпись, дата	М.А. Сорокина (раздел 1.1)
Зав. отделом	 _____ 21.01.20 подпись, дата	И.С. Спиридонов (раздел 1)
Ст. науч. сотр., канд. биол. наук	 _____ 21.01.20 подпись, дата	Ю.С. Судницына (раздел 1.1)

Инженер-исследователь

  
подпись, дата 21.01.20

С.С. Суров  
(раздел 1.1)

Мл. науч. сотр.

  
подпись, дата 21.01.20

Е.В. Тарасовец  
(раздел 1.2)

Ст. науч. сотр., канд. биол. наук

  
подпись, дата 21.01.20

К.Т. Турпаев  
(раздел 2.3)

Мл. науч. сотр.

  
подпись, дата 21.01.20

Н.Б. Устинов  
(раздел 1.2)

Стажер-исследователь

  
подпись, дата 21.01.20

О.Е. Ушакова  
(раздел 1.1)

Ведущий технолог, канд. биол. наук

  
подпись, дата 21.01.20

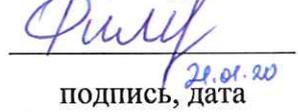
О.А. Фадеева  
(раздел 1.1)

Ст. науч. сотр., канд. биол. наук

  
подпись, дата 21.01.20

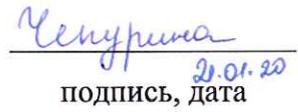
О.С. Федянина  
(раздел 2.1)

Мл. науч. сотр.

  
подпись, дата 21.01.20

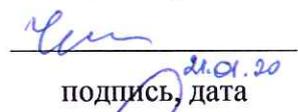
А.А. Филькова  
(раздел 1.1)

Мл. науч. сотр.

  
подпись, дата 21.01.20

Е.В. Чепурина  
(раздел 2.4)

Мл. науч. сотр.

  
подпись, дата 21.01.20

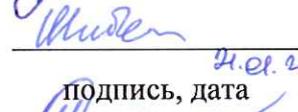
А.В. Чесноков  
(раздел 1.1)

Стажер-исследователь

  
подпись, дата 21.01.20

Т.О. Шепелюк  
(раздел 1.1)

Вед. науч. сотр., канд. биол. наук

  
подпись, дата 21.01.20

А.М. Шибeko  
(раздел 1.1)

Техник

  
подпись, дата 21.01.20

С.Р. Шляпина  
(раздел 1.1)

Мл. науч. сотр.

  
подпись, дата 21.01.20

А.А. Якушева  
(раздел 1.1)

## РЕФЕРАТ

Отчёт 124 стр., 68 рис., 6 табл., 19 источн.

СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ, ТРОМБОЦИТ, ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ, ФИБРИНОЛИЗ, БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ, ДЕЛЕНИЕ КЛЕТКИ, МИТОЗ, МИКРОТРУБОЧКА, ХРОМОСОМА, ДИАБЕТ, БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА, ДЕРМАТОЛОГИЯ

Объект исследования – сложные динамические диссипативные биологические саморегулирующиеся системы (система свертывания крови, веретено деления, клеточный метаболизм)

Цель работы – изучение биофизических и молекулярных механизмов регуляции движения хромосом в процессах деления клеток, тромбообразования, разработка новых методов диагностики нарушений свертывания крови, создание нового поколения плазмозамещающих противосвертывающих средств, а также выявление и изучение неблагоприятных факторов внешней среды, образа жизни и полиморфизма генов, определяющих предрасположенность к возникновению мультифакторных заболеваний.

### Основные результаты

- 1) стабильно высокий уровень цитоплазматического кальция является следствием, а не первичной причиной формирования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов;
- 2) фибриноген и интегрин  $\alpha IIb\beta 3$  играют существенную роль в связывании fXIII, без любого из этих компонентов фактор XIII не связывается с тромбоцитами;
- 3) с течением времени после активации тромбоцитов АДФ, не происходит изменения степени их активации в процессе агрегации;
- 4) обнаружено, что гиперкоагуляция с повышенной скоростью роста сгустка в анализе тромбодинамики перед началом цикла ЭКО ассоциирована с повышенным риском негативного исхода программы ЭКО;
- 5) экспериментально установлено, что белок EB3 может связываться не только на конце микротрубочки, но и часто накапливается вдоль ее решетки, вблизи конца, образуя «островки»; с помощью компьютерного моделирования было показано, что простой кинетики гидролиза ГТФ в карманах тубулина не достаточно для того, чтобы объяснить стохастическое возникновение ГТФ-островков;

- 6) мотор CENP-E и комплекс Ndc80 в микротрубочках представляют собой оптимально устроенную молекулярную систему, способную к конверсии кинетохора из латерального в концевое закрепление *in vitro*;
- 7) показано, что метаболизм фолата в печени крысы представляет собой типичный случай модульной организации клеточного метаболизма с несколькими отдельными метаболическими системами (метаболизм пуринов, метаболизм пиримидина, метаболизм метионина и т. д.), связанными через фолаты и функционирующими практически независимо друг от друга;
- 8) выявлено, что брусатол, дитерпеноид растительного происхождения, действует как избирательный ингибитор eIF5A, а также стимулирует гликолитический путь метаболизма глюкозы, что проявляется в увеличении выработки лактата.

# СОДЕРЖАНИЕ

стр.

ВВЕДЕНИЕ.....	14
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	16
1. Изучение биофизических и молекулярных механизмов регуляции движения хромосом в процессах деления клеток, тромбообразования, разработка новых методов диагностики нарушений свертывания крови и создание нового поколения плазмозамещающих противосвертывающих средств .....	16
1.1. Исследование системы свертывания крови .....	16
1.1.1. Анализ конформационной динамики фактора фон Виллебранда при стенозе .....	16
1.1.2. Роль кальциевой сигнализации в формировании субпопуляций тромбоцитов .....	18
1.1.3. Взаимодействие фактора свертывания XIII с субпопуляциями активированных тромбоцитов: роль интегрина $\alpha IIb\beta 3$ и фибриногена .....	22
1.1.4. Определение механизмов обратимой агрегации тромбоцитов.....	26
1.1.5. Внутриклеточная сигнализации при активации тромбоцитов через рецептор CLEC-2.....	29
1.1.6. Разработка метода ex vivo исследования взаимодействия тромбоцитов и нейтрофилов .....	31
1.1.7. Исследование кальциевой сигнализации тромбоцитов с помощью проточной цитометрии .....	32
1.1.8. Компьютерная модель активации комплекса внешней теназы на поверхности везикул.....	35
1.1.9. Исследования механизмов регуляции пространственного фибринолиза в условиях потока в области сложной геометрии.....	36
1.1.10. Использование системного моделирования для персонализированного подхода при коррекции гемостаза .....	42
1.1.11. Функциональная активность тромбоцитов у взрослых пациентов с хронической иммунной тромбоцитопенией на фоне лечения ромиплостимом.....	48
1.1.12. Состояние системы свертывания у пациентов при проведении процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) .....	51
1.1.13. Прокоагулянтная активность микровезикул, полученных из разных клеток.....	58
1.1.14. Спектроскопические исследования взаимодействия белков плазмы крови с флуоресцентными маркерами с целью моделирования связывания белков с различными лигандами, в том числе и с некоторыми лекарственными препаратами .....	71
1.2. Исследование механизмов деления клетки .....	78
1.2.1. Исследование свойств EB-белков в микротрубочках.....	78
1.2.2. Исследования одиночных молекул комплекса NDC80 и ансамблей данного белка и его мутантов с динамическими концами микротрубочек.....	84
2. Выявление и изучение неблагоприятных факторов внешней среды, образа жизни и полиморфизма генов, определяющих предрасположенность к возникновению мультифакторных заболеваний как основа предиктивной медицины.....	91
2.1. Новые методы диагностики заболеваний системы кроветворения.....	91

2.1.1.	Разработка критериев дифференциальной диагностики ОМЛ на основе данных о морфологии, цитохимии и наборе дифференцировочных антигенов, присутствующем на поверхности опухолевых клеток, определяемых с помощью клеточного биочипа .....	91
2.1.2.	Разработка новых тест-систем для диагностики заболеваний системы комплемента и испытаний новых фармакологических препаратов .....	97
2.2.	Математическое моделирование клеточного метаболизма в клетках организма человека.....	98
2.2.1.	Математическое моделирование клеточного метаболизма фолатов в гепатоцитах .....	99
2.3.	Новые методы терапии социально-значимых заболеваний.....	103
2.3.1.	Фармакологическое подавление цитотоксического действия про-воспалительных цитокинов на островковые бета-клетки .....	103
2.3.2.	Разработка метода патогенетической терапии моторных (брадикинизия, ригидность, тремор) и немоторных (депрессия) нарушений при болезни Паркинсона .....	108
2.4.	Дерматология.....	112
2.4.1.	Поиск и изучение молекулярно-генетических маркеров ассоциированных с дерматологическими и психическими заболеваниями .....	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....		121
Список использованных источников.....		123

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

AUC – площадь под ROC-кривой

CLEC-2 - C-type lectin-like receptor 2

COX2 - циклооксигеназа 2

DBH - доФамин- $\beta$ -гидроксилаза

FSC – прямое светорассеяние

fXIII – фактор свертывания XIII

GP1b – гликопротеин 1b

IL-1 $\beta$  - интерлейкин 1, бета

iNOS - индуцибельная синтаза оксида азота

LRP - богатая лейкоцитами и тромбоцитами плазма

MAP - белки, ассоциированные с микротрубочками

MTHFC - метилтетрагидрофолатциклогидролаза

MTHFD - метилтетрагидрофолатдегидрогеназа

PAI-1 – ингибитор активации плазминогена-1

PLC $\gamma$ 2 - фосфолипаза C $\gamma$ 2

ROC - receiver operating characteristic

SHMT - сериновая гидроксиметилтрансфераза

TNF $\alpha$  - фактор некроза опухоли

VIIa/TF – внешняя теназа (комплекс фактора свертывания VIIa с тканевым фактором)

aГУС - атипичный гемолитико-уремический синдром

АДФ - аденозиндифосфат

АФА - активные формы кислорода

АФК - активные формы кислорода

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

БСА - бычий сывороточный альбумин

ГКБ – гоородская клиническая больница

ГТФ - гуанозинтрифосфат

ИТП – имунная тромбоцитопения

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

ЛПС - липополисахариды

МТ - микротрубочка

МВ - микровезикулы

ММ – миелоцитарный балл

ММР - матричные металлопротеиназы

Мс - миллисекунда

НМГ – низкомолекулярный гепарин

ОДУ - обыкновенные дифференциальные уравнения

ОЛ – острый лейкоз

ОМЛ – острый миелобластный лейкоз

Па - Паскаль

ПВ – протромбиновое время

ПНГ - пароксизмальная ночная гемоглобинурия

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СВО - синдром Вискотта-Олдрича

ТМРМ - тетраметилродамин

ТПА (ТРА) – тканевый активатор плазминогена

ТФ – тканевый фактор

ФИТЦ – флуоресцеина изотиоцианат

ФС - фосфатидилсерин

ХМЛ - хронический миелобластный лейкоз

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

ЭР - эндоплазматический ретикулум

ЮММЛ - Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз

## ВВЕДЕНИЕ

Система свертывания призвана минимизировать кровопотерю после возникновения повреждения сосудистой стенки путем формирования нерастворимого фибринового сгустка в этом месте. Эта система должна, с одной стороны, поддерживать нормальную текучесть крови в физиологических условиях и обеспечивать перфузию тканей организма, а с другой стороны – реагировать взрывным образом на повреждение целостности сосудистого русла и обеспечивать остановку кровотечения в месте повреждения. Эта система является одной из наиболее «проблемных» физиологических систем организма. Нарушения ее баланса встречаются очень часто при самых разных патологических или даже физиологических ситуациях (травмы и кровопотеря, инфекция и сепсис, онкологические и сердечно-сосудистые заболевания, хирургические операции и беременность) и приводят к кровоизлияниям или, наоборот, угрожают тромбозами.

Во время митотического деления клеток микротрубочки существенно меняют свою внутриклеточную организацию. Благодаря способности к сборке и разборке, они перестраиваются из радиальной структуры в би-полярную и образуют митотическое веретено деления. При этом целый набор белков-регуляторов отвечает подстройку динамики микротрубочек адекватно текущим задачам клетки. Понимание принципов митотического деления требует изучения механизмов этой регуляции. Понимание механизмов нарушения митоза, приводящих к анеуплоидии и ошибкам деления, может оказаться принципиально новым направлением коррекции регенеративных процессов в онкологии. Хорошо известно, что современная терапия онкозаболеваний направлена на уничтожение делящихся клеток, как нормальных, так и опухолевых. Поэтому процессы регенерации органов и тканей являются важнейшей частью терапии. После терапии цитотоксическими и цитостатическими препаратами, а часто и во время нее, неизбежно возникает большая масса делящихся клеток, как нормальных, так и с дефектами деления. Как следствие – резко возрастает риск появления новых трансформированных клонов – источников метастазирования. Этот риск можно снизить, если в процессе онкотерапии защитить и усилить механизмы исправления ошибок в процессе деления клеток.

Неблагоприятные факторы внешней среды, образа жизни и полиморфизма генов зачастую определяют предрасположенность к возникновению мультифакторных заболеваний. К таким заболеваниям относят онкологические заболевания, нарушения обмена веществ, неврологические заболевания, дерматологические заболевания. Математическое моделирование метаболических процессов, характерных для данных

заболеваний, позволит выявить механизмы их возникновения, а также продвинет поиск новых методик диагностики и терапии.

В настоящем исследовании мы планируем, проведение трансляционных исследований и математическое моделирование процессов формирования тромбов, деления клеток и различных метаболических процессов в норме и при патологии. Мы попытаемся с помощью математических моделей выяснить закономерности, характерные для данных процессов. Это позволит нам выявить механизмы нарушений при различных патологиях и внести изменения в их диагностику и лечение заболеваний.

## **ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

**1. Изучение биофизических и молекулярных механизмов регуляции движения хромосом в процессах деления клеток, тромбообразования, разработка новых методов диагностики нарушений свертывания крови и создание нового поколения плазмозамещающих противосвертывающих средств**

### **1.1. Исследование системы свертывания крови**

**1.1.1. Анализ конформационной динамики фактора фон Виллебранда при стенозе**

Фактор фон Виллебранда – самый крупный гликопротеин кровотока, который отвечает за остановку кровотоков за счет способности взаимодействовать с тромбоцитами и белками субэндотелиального матрикса. Данный белок играет ключевую роль в первичной адгезии тромбоцитов в условиях артериальных скоростей сдвига и, по всей видимости, является одним из важных участников формирования окклюзивных тромбов в условиях экстремальных гидродинамических условий, наблюдаемых при стенозе просвета сосуда (например, – из-за атеросклероза). Несмотря на долгую историю исследований, детальные механизмы, отвечающие за формирование тромба в условиях сужения просвета сосуда в настоящее время остаются предметом исследования. В сотрудничестве с коллегами из лаборатории Пьера Монжана (Страсбург, Франция), нам удалось показать, что при наличии достаточного сужения канала, формирование тромба может инициироваться даже при наличии фибриногена на поверхности канала – адгезивного белка, который до недавнего времени не рассматривался в качестве потенциального инициатора тромбообразования. Для объяснения данного феномена была предложена гипотеза, связывающая наблюдаемый феномен с конформационной динамикой фактора фон Виллебранда в условиях сужения канала и его взаимодействием с иммобилизованным фибриногеном.

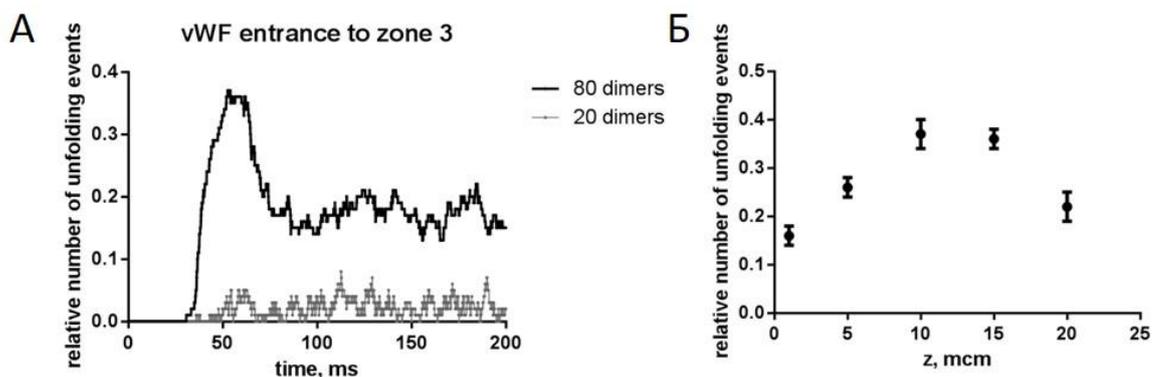


Рисунок 1. Относительное количество актов разворачивания молекулы фактора Виллебранда при его движении в области сужения просвета канала в зависимости от времени (А) и высоты движения над нижней поверхностью канала (Б). (А) Представлена временная зависимость относительного количества актов раскрытия от времени движения в системе. В момент времени 50 мс фактор находится в области начала узкой части канала (зона 3). Именно в этой области, где максимален продольный градиент скорости течения, наблюдается усиленное разворачивание длинных мультимеров (80 димеров), но не более коротких (20 димеров). Результаты получены путем анализа 100 траекторий движений молекулы на высоте 10 микрон от горизонтальной поверхности канала. (Б) Представлена зависимость относительного количества актов раскрытия от высоты движения молекулы над поверхностью (указаны максимальные значения для крупных мультимеров длиной 80 димеров).

Для изучения данной гипотезы была разработана компьютерная модель фактора Виллебранда, позволяющая исследовать его конформационную динамику в гидродинамических условиях, соответствующих экспериментальной модели тромбообразования. Проведенный анализ (Рисунок 1) позволил установить, что наличие продольных градиентов скорости течения в области сужения просвета канала (так называемая скорость элонгации) приводит к значительному увеличению вероятности раскрытия крупных мультимеров при их движении на достаточной высоте над фибриногеном: максимальный эффект достигается на высоте около 10 микрометров.

Данный эффект позволяет объяснить, почему формирование тромбов часто инициируется на достаточно большом расстоянии от начала сужения канала: активированным молекулам фактора фон Виллебранда требуется некоторое время для попадания на поверхность при их активации на некоторой высоте над поверхностью. За это время молекулы успевают преодолеть существенное расстояние вдоль канала.

Для анализа возможных механизмов ускорения тромбообразования, экспериментально наблюдаемого после первичной адгезии тромбоцитов на фибриноген, методами вычислительной гидродинамики был проведен теоретический анализ поля скоростей вблизи отдельных тромбоцитов, расположенных у поверхности канала (на фибриногене).

Полученные результаты (Рисунок 2) позволяют предположить, что ускоренное тромбообразование, наблюдаемое после первичной адгезии тромбоцитов, может объясняться несколькими эффектами, включающими существенное увеличение скорости сдвига на поверхности закрепленных тромбоцитов (которое может приводить к раскрытию мультимеров фактора фон Виллебранда, закрепленных на поверхности этих клеток через рецептор GPIb), а также эффект сжатия поля скоростей, который значительно увеличивает скорость транспорта молекул и клеток к поверхности первично закрепленных тромбоцитов.

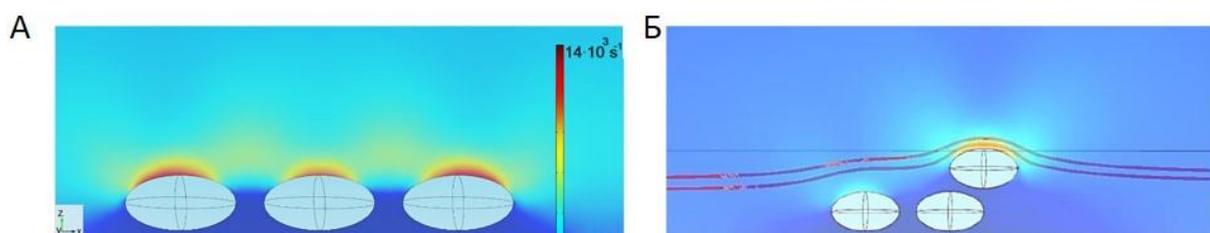


Рисунок 2. Распределение скорости сдвига на поверхности тромбоцитов, а также линии тока, полученные при помощи вычислительной гидродинамики. (А) Карта распределения скорости сдвига на поверхности трех тромбоцитов, расположенных на поверхности канала. Максимальная скорость сдвига, достигаемая на поверхности, превосходит величину в  $10\,000 \text{ с}^{-1}$  – которая считается критической для раскрытия фактора фон Виллебранда. (Б) Расположение линий тока демонстрирует эффект сжатия поля скоростей при обтекании препятствия в виде второго слоя тромбоцитов. Данный эффект приводит к увеличению частоты взаимодействия объектов конечного размера (мультимеров фактора фон Виллебранда и тромбоцитов) с поверхностью закрепленных тромбоцитов.

### 1.1.2. Роль кальциевой сигнализации в формировании субпопуляций тромбоцитов

Тромбоциты – безъядерные клетки, чьей основной функцией является формирование тромба, циркулирующие в крови в неактивном состоянии. В ответ на действие физиологических активаторов, таких как тромбин и коллаген, они переходят в

активное состояние и разделяются на две субпопуляции, отличающиеся составом белков на поверхности клетки, морфологией и свойствами:

- a. активированные, но не-прокоагулянтные тромбоциты (фосфатидилсерин отрицательные, ФС-) не обладают свойством ускорять процессы свёртывания, но содержат активированные интегрины, за счёт которых они способны к агрегации;
- b. прокоагулянтные тромбоциты (ФС+) обладают свойством ускорять процессы свертывания крови до пяти порядков посредством отрицательно заряженных фосфолипидов (в основном фосфатидилсерин), выступающих в роли площадок на поверхности клеток, «собирающих» комплексы из факторов свертывания: внутреннюю теназу и протромбиназу. Такие клетки не агрегируют, несмотря на то, что имеют на своей поверхности белки из альфа-гранул. Их цитоскелет деградирует.

Распределение тромбоцитов по субпопуляциям зависит от степени активации, а не предопределено заранее. В клинических исследованиях показано, что количество прокоагулянтных тромбоцитов коррелирует с некоторыми патологиями.

Имеются противоречивые гипотезы, что на переход тромбоцита в прокоагулянтное состояние при активации влияют динамика цитоплазматического кальция (стабильно высокий уровень кальция после стимуляции) в активированных тромбоцитах и состояние митохондрий (перегрузка кальцием и формирование митохондриальной поры). Однако взаимосвязь этих процессов в клетке при формировании субпопуляций практически не изучена. Для разрешения этих противоречий требуется одновременно изучить динамику цитоплазматического кальция и состояние митохондрий отдельных тромбоцитов в процессе активации и формирования прокоагулянтной субпопуляции.

Тромбоциты выделялись из цельной крови, нагружались зондами на внутриклеточный кальций (радиометрический зонд Фура ред) и индикатором митохондриального потенциала тетраметилродамином (ТМРМ), затем иммобилизовывались на стекле, покрытом фибриногеном. Неприкрепившиеся клетки смывались буфером Тирода (с добавлением 1.5 мМ хлорида кальция и 0.5% БСА), после чего добавлялось 1.5% лактадгерин-ФИТЦ - маркера на фосфатидилсерин, и начиналась видеосъёмка флуоресцентных зондов на конфокальном микроскопе (Zeiss). После начала съёмки тромбоциты активировались 100 нМ тромбина. Для анализа полученных данных применялось программное обеспечение ImageJ и AxioVision (Zeiss).

Были проведены эксперименты по измерению динамики внутриклеточного кальция, потенциала митохондриальной мембраны и выхода отрицательно заряженных фосфолипидов в одиночных тромбоцитах в ответ на активацию тромбином (Рисунок 3).

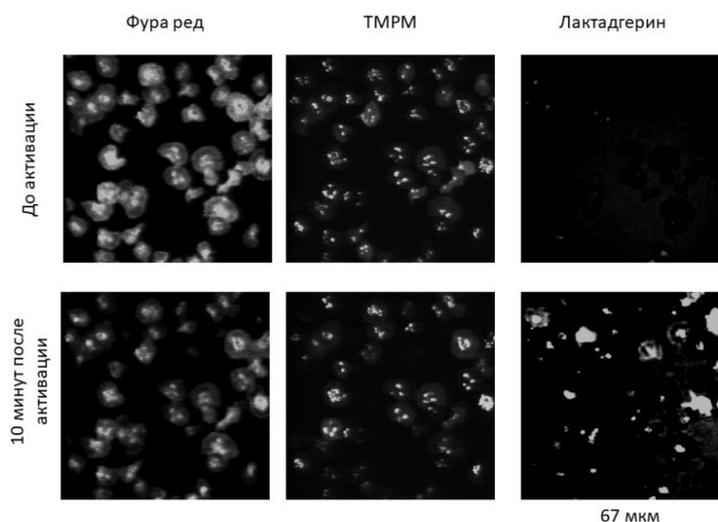


Рисунок 3. Конфокальная микроскопия тромбоцитов до и после активации. Фура ред – ратиометрический индикатор внутриклеточного кальция флуоресценция, TMPM – тетраметилродамин – индикатор потенциала митохондриальной мембраны, лактадгерин – индикатор ФС+ тромбоцитов. Ширина кадров 67 мкм.

В результате активации часть тромбоцитов переходила в прокоагулянтное состояние с экспонированным ФС (ФС+), а часть оставалась ФС отрицательными. В клетках, ставших прокоагулянтными, происходило 3 перекрывающихся друг с другом процесса: подъем уровня цитоплазматического кальция, падение митохондриального потенциала и выход фосфатидилсерина. Была определена последовательность этих внутриклеточных процессов: сначала наблюдалось небольшое повышение внутриклеточного кальция, затем пропал потенциал на митохондриях и начинался выход ФС. Первые признаки выхода ФС проявлялись при уровне внутриклеточного кальция порядка 500-1000 нМ (пересчет в концентрацию производился по отношению флуоресценций зонда Фура ред при возбуждении длинами волн 405 нм и 488 нм). Процесс перехода в состояние ФС+ занимал всего десятки секунд (Рисунок 4).

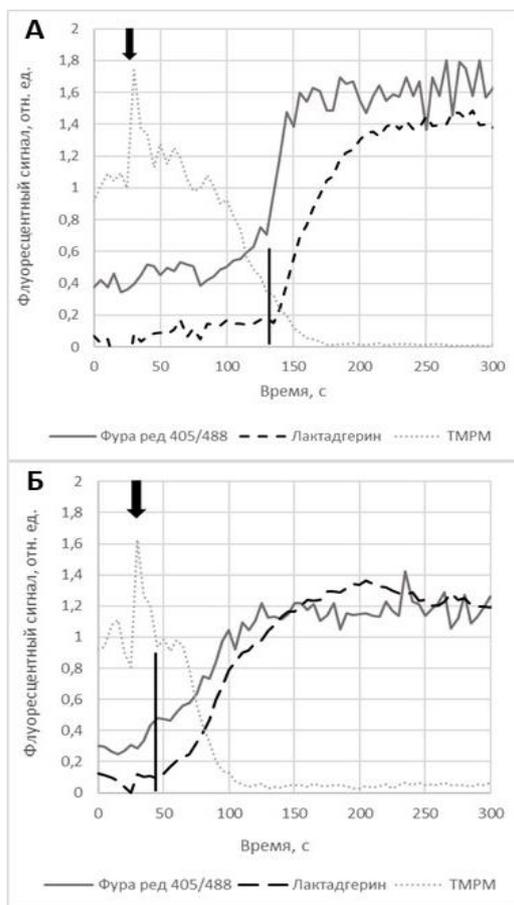


Рисунок 4. Типичные графики динамики внутриклеточного кальция (соответствует отношению флуоресценции зонда Фура ред на длинах возбуждения 405 нм и 488 нм), потенциала митохондриальной мембраны (TMPM) и выхода ФС (лактадгерин) в тромбоцитах, перешедших в ФС+ субпопуляцию. Тромбоцит 1 (А) и тромбоцит 2 (Б). Черная стрелка соответствует моменту добавления 100 нМ тромбина, вертикальная черта соответствует появлению первых признаков выхода ФС.

Результатом выполненной работы является выявление последовательности сигнальных процессов, происходящих в одиночных клетках разных субпопуляций при активации тромбином. Несмотря на то, что различия этих субпопуляций, такие как потенциал митохондриальной мембраны и разный уровень кальция после активации, были известны, эти результаты не могли полноценно описать динамику внутриклеточных процессов во время перехода тромбоцита в прокоагулянтное состояние, так как были получены при помощи проточной цитометрии. Это породило противоречивые гипотезы о причинно-следственных связях, ответственных за выбор клеткой субпопуляции. Благодаря использованию методов микроскопии удалось произвести наблюдение за отдельными клетками в процессе активации, и была выявлена последовательность внутриклеточных процессов, ведущих тромбоцит к смерти: активация тромбоцита

запускала в нем небольшой подъем внутриклеточного кальция, способствующий накоплению кальция в митохондриях, вследствие этого в части клеток происходил коллапс митохондрий, являющийся триггером перехода в ФС+ состояние. Уровень внутриклеточного кальция начал резко увеличиваться одновременно с экспонированием фосфатидилсерина. Таким образом, удалось установить, что стабильно высокий уровень цитоплазматического кальция является следствием, а не первичной причиной формирования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов.

### **1.1.3. Взаимодействие фактора свертывания XIII с субпопуляциями активированных тромбоцитов: роль интегрина $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ и фибриногена**

Фактор свертывания XIII представляет собой плазменный  $\beta$ -глобулин, циркулирующий в кровотоке в концентрации 14-28 мкг/мл (~88 нМ). Кроме того, фактор XIII присутствует в цитоплазме тромбоцитов и секретируется из них при активации. После частичного протеолиза тромбином образуется активная форма – трансклутаминаза фактор XIIIa. Основной ролью фактора XIIIa является образование сшивок между молекулами фибрина, что приводит к стабилизации сгустка и препятствует его лизису фибринолитическими ферментами. Как было показано ранее при сильной активации физиологическими агонистами тромбоциты разделяются на две субпопуляции сильно отличающиеся по своим свойствам. Так, например, было показано, что факторы свертывания преимущественно связываются с одной субпопуляцией тромбоцитов, экспонирующей на внешнем слое мембраны фосфатидилсерин. Данные тромбоциты представляют собой шарообразные клетки радиусом около 2 мкм с небольшим уплотнением радиусом около 1 мкм, в которой содержится большое количество адгезионных белков.

Для данной работы были использованы тромбоциты, выделенные из цельной крови здоровых доноров. В качестве активаторов тромбоцитов были использованы тромбин (100 нМ), АДФ (100 мкМ) или коллаген-подобный пептид (20 мкг/мл). Связывание флуоресцентно-меченного фактора XIII с активированными тромбоцитами оценивали с помощью проточных цитометров Accuri C6; Acea NovoCyte 3000, а также с помощью конфокального микроскопа Zeiss Axio Observer Z1.

В ходе работы было показано, что фактор свертывания XIII связывается преимущественно с субпопуляцией фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов, полученных при активации тромбином или коллаген-подобным пептидом. При этом при добавлении физиологической концентрации с фосфатидилсерин-положительными тромбоцитами связывается около 700-800 молекул на клетку, а с фосфатидилсерин-

отрицательными около 200-300 молекул на клетку. Связывание фактора XIII с тромбоцитами  $Ca^{2+}$ -независимое и линейное, без насыщения в диапазоне концентраций от 0 до 250 нМ (Рисунок 5). Нами было показано, что фактор XIII взаимодействует с тромбоцитами не напрямую, а через фибриноген, который, в свою очередь, связан с интегрином  $\alpha IIb\beta 3$  или удерживается на поверхности тромбоцитов за счет полимеризации. Как плазменный, так и тромбоцитарный фактор XIII распределен неоднородно на мембране фосфатидилсерин -положительных тромбоцитов, и в основном сконцентрирован в небольшой области мембраны также, как фибриноген.

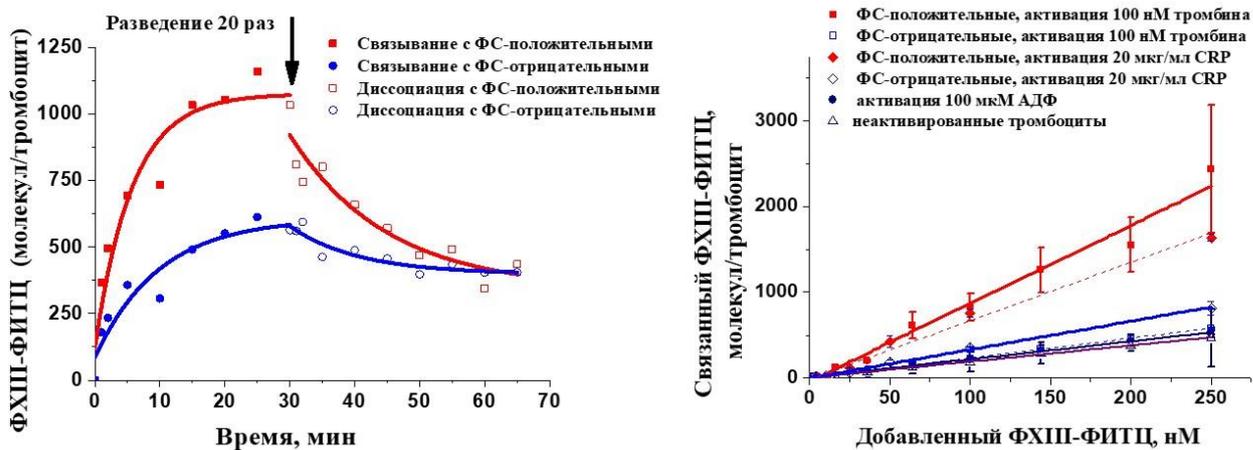


Рисунок 5. Взаимодействие плазменного фактора XIII с активированными тромбоцитами.

Полученные результаты по биохимии связывания зимогена фактора XIII с тромбоцитами хорошо согласуются с литературными данными о его активной форме факторе XIIIa. Было несколько работ, показывающих взаимодействие фактора XIIIa с тромбоцитами через интегрин  $\alpha IIb\beta 3$  и  $\gamma$ -цепь фибриногена. Кроме того, совсем недавно связывание зимогена фактора XIII с фибриногеном было хорошо охарактеризовано на молекулярном уровне. Все эти возможные сценарии были показаны в рамках данного исследования.

Активация тромбоцитов АДФ вызывает конформационные изменения в интегрене  $\alpha IIb\beta 3$ , но без значительной секреции  $\alpha$ -гранул. Такие тромбоциты не способны связывать фактор XIII. При этом добавление внешнего фибриногена увеличивает связывание фактора, а ингибитор интегрин  $\alpha IIb\beta 3$  (монафрам) возвращал связывание на первоначальный уровень (Рисунок 6). Когда этот эксперимент был проведен с тромбин-активированными тромбоцитами, ФС-отрицательные тромбоциты работали аналогично АДФ-стимулированным: добавление внешнего фибриногена приводило к увеличению связывания фактора XIII, а при добавлении монафрама связывание возвращалось к

первоначальному уровню. Эти данные указывают на то, что активированный интегрин  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  действительно способен связывать зимоген fXIII через фибриноген. Однако, эти эффекты не наблюдались для FC-положительных тромбоцитов. Действительно, из литературы известно, что эти тромбоциты не связывают внешний фибриноген, а связывание альфа-гранулярного фибриногена не ингибируется монафрамом.

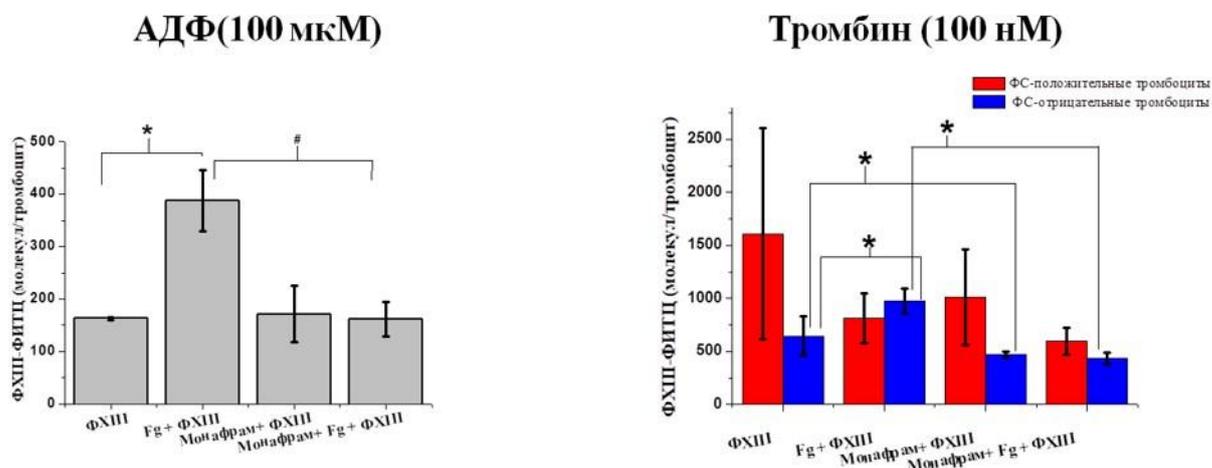


Рисунок 6. Механизмы взаимодействия фактора XIII с активированными тромбоцитами

В качестве дополнительного контроля для связывания фактора XIII с тромбоцитами, мы использовали тромбоциты от пациентов с тромбастенией Гланцмана. На тромбоцитах таких пациентов отсутствует интегрин, а в альфа-гранулах содержится меньше фибриногена. Обе субпопуляции активированных тромбоцитов для пациентов с тромбастенией Гланцмана связывают достоверно меньше фактора XIII, чем тромбоциты доноров. Это указывает, что интегрин  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  может участвовать во взаимодействии fXIII с активированными тромбоцитами.

Кроме того, были использованы тромбоциты от пациентов с синдромом серых тромбоцитов. В тромбоцитах таких пациентов отсутствуют  $\alpha$ -гранулы и как следствие эндогенный фибриноген. Полученные данные показывают, что связывание фактора XIII с тромбоцитами у этих пациентов было значительно снижено (Рисунок 7) (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ). Таким образом, видимо, и  $\alpha$ -гранулярные белки (фибриноген) и интегрин  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  являются существенными для связывания фактора XIII.

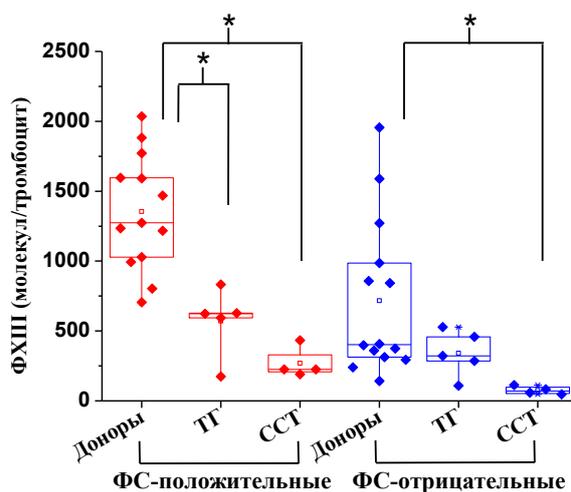


Рисунок 7. Взаимодействие fXIII с тромбоцитами пациентов с наследственными тромбоцитопатиями

В ходе работы было охарактеризовано пространственное распределение зимогена фактора XIII мембране тромбоцитов. Было обнаружено, что он взаимодействует как с FC-положительными, так и с FC-отрицательными тромбоцитами, но по-разному. Фактор XIII связывается с небольшим регионом на мембране FC-положительных тромбоцитов и солокализирован с фибриногеном, из  $\alpha$ -гранул тромбоцитов. Связывание фактора XIII с FC-отрицательными тромбоцитами было ниже и в основном с центральной частью тромбоцитов, в которой расположена большая часть гранул (Рисунок 8).

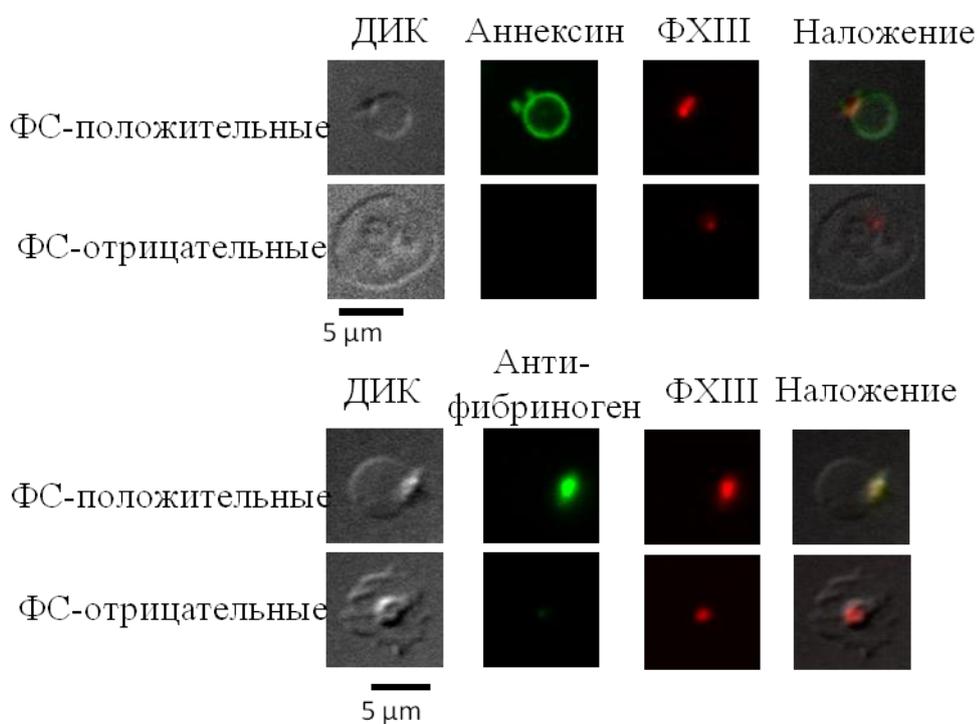


Рисунок 8. Распределение fXIII на мембране активированных тромбоцитов.

Для характеристики распределения фактора XIII в тромбоцитарных тромбах в условиях потока были использованы плоско-параллельные камеры с нанесенным внутри коллагеном. Было показано, что фактор локализован в центральной части тромбов, в то время как ФС-положительные тромбоциты на периферии. То есть в условиях потока фактор предпочтительно взаимодействует с ФС-отрицательными тромбоцитами, чем с ФС-положительными клетками (Рисунок 9).

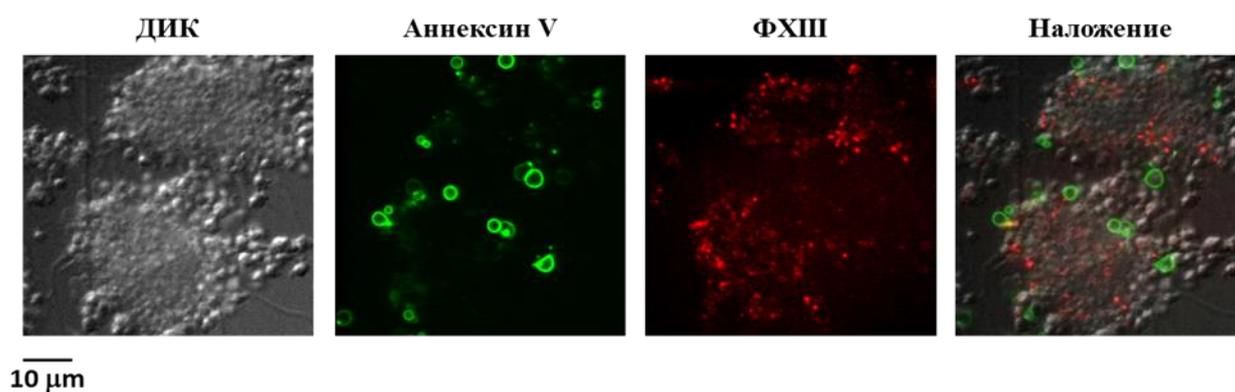


Рисунок 9. Распределение fXIII в тромбах.

Таким образом, мы имеем два разных механизма взаимодействия фактора XIII с субпопуляциями активированных тромбоцитов. В обоих случаях фактор связан с фибриногеном. В суспензии отмытых тромбоцитов весь доступный фибриноген выходит из  $\alpha$ -гранул, поэтому фактор будет связываться преимущественно с ФС-положительными тромбоцитами. В случае, когда существует много внешнего фибриногена, например, в условиях тромба в потоке, фибриноген из плазмы крови будет связываться с ФС-отрицательными тромбоцитами через активные интегрин  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 и, соответственно, фактор будет преимущественно связываться с ФС-отрицательными тромбоцитами.

Таким образом, фибриноген и интегрин  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 играют существенную роль в связывании fXIII, без любого из этих компонентов фактор XIII не связывается с тромбоцитами.

#### 1.1.4. Определение механизмов обратимой агрегации тромбоцитов

Агрегометрия – клинический подход для оценки функциональных характеристик тромбоцитов. Метод агрегометрии основан на анализе изменения светопропускания богатой тромбоцитами плазмы или суспензии отмытых тромбоцитов при агрегации в

ответ на активацию. В настоящее время агрегометрия является одним из золотых стандартов для исследования тромбоцитарного звена свёртывания у пациентов.

Для исследования механизмов формирования агрегатов при агрегометрии в лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии ЦТП ФХФ РАН была разработана простая кинетическая модель, основывающаяся на законах действующих масс. Модель состояла из двух ОДУ, описывающих зависимость концентраций отдельных тромбоцитов и тромбоцитарных агрегатов:

$$\frac{dp}{dt} = -k_1np - 2k_2p^2 + k_{-1}n$$

$$\frac{dn}{dt} = k_2p^2 - k_{-2}n^2 + k_3n,$$

где  $p, n$  – концентрация отдельных тромбоцитов и тромбоцитарных агрегатов, соответственно. Значение агрегации было оценено по формуле:

$$Aggregation = 100\% * \exp\left(\frac{ap + n - p_0}{p_0}\right),$$

где параметр  $a$  вводится как характеристика изменения формы тромбоцитами при активации (Рисунок 8). При аппроксимации экспериментальных данных моделью, была получена корреляция параметров модели с концентрациями АДФ, добавленного к тромбоцитам (Рисунок 8 Б), при этом, параметры модели с течением времени не изменялись.

Также была разработана полноценная модель агрегации, учитывающая поведение агрегатов всех размеров. Модель содержала 4 параметра: константы ассоциации и диссоциации одиночных тромбоцитов, а также константы ассоциации и диссоциации тромбоцитарных агрегатов:

$$\begin{aligned} \frac{dp}{dt} &= -k_1p \sum_{i=2}^{N-1} [i] - 2k_2p^2 + k_{-1}\left(\sum_{i=2}^N [i] + [2]\right) \\ \dots \\ \frac{d[j]}{dt} &= k_{-2}\left(\sum_{i=2}^{j/2} [i][j-i] - [j]\sum_{i=2}^{N-j} [i]\right) + k_3\left(\sum_{i=j+2}^N [i] - \left(\left[\frac{j}{2}\right] - 1\right)[j]\right) \\ &\quad - k_1p([j] - [j-1]) + k_{-1}([j+1] - [j]) \end{aligned}$$

Было получено соответствие полной кинетической модели агрегации тромбоцитов и сокращённой модели.

На основании данных результатов можно сделать вывод, что с течением времени после активации тромбоцитов АДФ, не происходит изменения степени их активации в процессе агрегации. Это было экспериментально подтверждено посредством проточной цитометрии: в различных точках агрегационной кривой степень активации тромбоцитарных интегринов сохранялась. Таким образом, несмотря на образование крупных агрегатов сразу после активации, распадающихся с течением времени, пост-агрегатные тромбоциты образуют новые агрегаты с меньшей вероятностью.

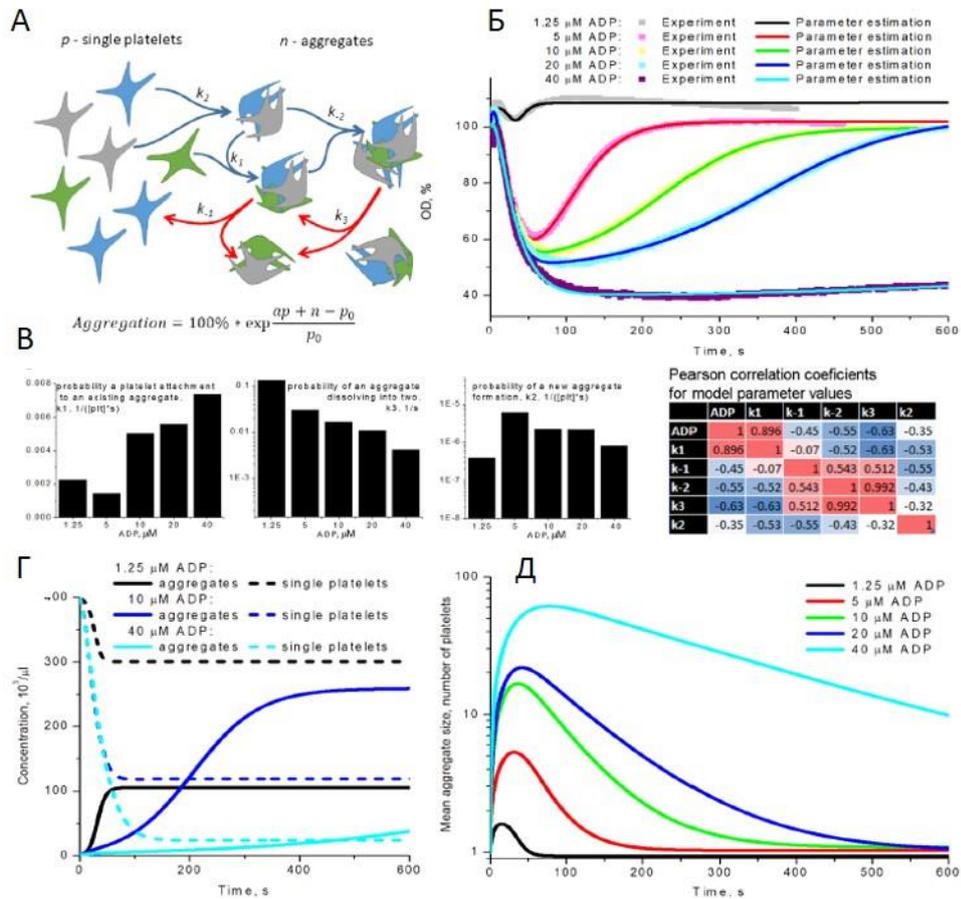


Рисунок 8. Компьютерная модель агрегации тромбоцитов. Схема модели (А): при активации одиночные тромбоциты образуют агрегаты, которые также могут присоединять отдельные тромбоциты. С другой стороны, кластеры могут распадаться, образуя кластеры меньшего размера или кластеры и отдельные тромбоциты. Определение неизвестных параметров модели было проведено в автоматическом режиме в программном пакете COPASI (Б – Д). Для каждого набора экспериментальных данных параметры были определены отдельно. Характерные параметры для активации тромбоцитов различными концентрациями АДФ были  $k_1 = (2.2, 1.4, 5, 5.6, 7.3) \cdot 10^{-2} 1/([\text{тромб.}] \cdot \text{с})$ ;  $k_{-1} = (0.67, 0.13, 0.59, 0.54, 0.18) 1/\text{с}$ ;  $k_{-2} = (1.2, 0.1, 0.063, 0.036, 0.023) \cdot 10^{-3} 1/([\text{тромб.}] \cdot \text{с})$ ;  $k_3 = (13, 3, 1.6, 1, 0.4) \cdot 10^{-2} 1/\text{с}$ ;  $k_2 = (4, 60, 22, 21, 8.1) \cdot 10^{-7} 1/([\text{тромб.}] \cdot \text{с})$ ;  $a = (1.08, 1.16, 1.17, 1.19, 1.14)$ ;  $p_0 = (400, 405, 400, 400, 400) [\text{тромб.}]$ . Зависимость значений параметров от

концентрации АДФ была оценена с помощью критерия Пирсона (V). Зависимости концентрации одиночных тромбоцитов, тромбоцитарных агрегатов, а также среднего размера кластера от времени приведены на Г и Д, соответственно.

### **1.1.5. Внутриклеточная сигнализации при активации тромбоцитов через рецептор CLEC-2**

Разработанный подход был использован для построения компьютерной модели активации тромбоцитов через рецептор CLEC-2. Данный рецептор, вместе с его лигандом подопланином, является одним из ключевых для предотвращения смешения крови и лимфы у взрослых организмов. С другой стороны, роль CLEC-2 была продемонстрирована и для ряда патофизиологических процессов. В цитоплазматическом домене CLEC-2 присутствует иммунный тирозиновый активационный мотив, который оказывается быстро фосфорилирован Syk киназами при связывании CLEC-2 с лигандами. Это приводит к активации тирозинкиназного сигнального каскада, кульминацией которого является сборка LAT-сигналысомы, в составе которой присутствует фосфолипаза  $PLC\gamma 2$  ( $PLC\gamma 2$ ). Активные  $PLC\gamma 2$  производят инозитол трифосфат, запускающий кальциевую сигнализацию в тромбоците (Рисунок 9).

Компьютерная модель, состоящая из системы дифференциальных уравнений, была использована для определения лимитирующих стадий в процессе активации тромбоцитов. Модель состояла из 4х модулей: модуль кластеризации CLEC-2 (Рисунок 9 А), модуль покоящегося состояния (Рисунок 9 Б), модуль тирозинкиназ (Рисунок 9 В), LAT- $PLC\gamma 2$  модуль и кальциевый модуль (Рисунок 9 Г). Модель состояла из 18 уравнений, основанных на законах действующей массы и Михаэлиса Ментен. В модель входил 51 параметр, из которых 35 было получено из литературы. Неизвестные параметры были получены на основе литературных данных.

В результате моделирования было получено, что активация тромбоцита через рецептор CLEC-2 лимитируется не только активацией тирозинкиназ, но и скоростью формирования кластера рецепторов. Данный вывод был подтверждён экспериментально посредством проточной цитометрии и микроскопии полного внутреннего отражения при различных температурах, а также различном насыщении мембраны тромбоцита холестерином. Дополнительные доказательства были получены в результате экспериментов по вестерн-блоттингу.

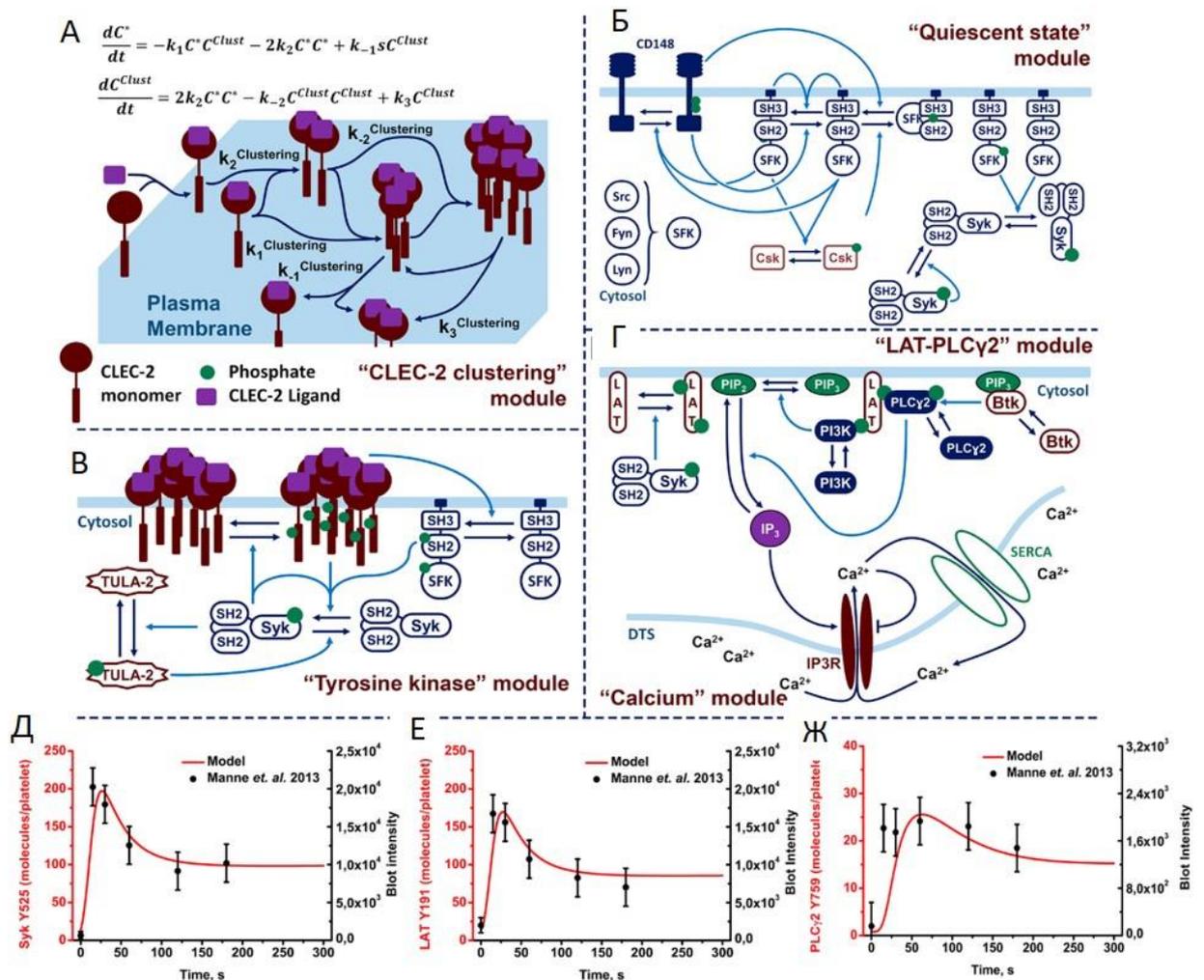


Рисунок 9. Модель активации тромбоцитов через рецептор CLEC-2. Модуль кластеризации CLEC-2 (А): после связывания с молекулами активатора, молекулы CLEC-2 формировали кластеры. Активированные молекулы CLEC-2 могли формировать кластеры, которые могли формировать кластеры большего размера связываясь с другими кластерами или с отдельными молекулами активированного CLEC-2. С другой стороны, кластеры распадались на кластеры меньшего размера или же кластеры и отдельные молекулы CLEC-2. Модуль покоящегося состояния (Б): активные фосфатазы CD148 производили 1/3 активные SFK, которые инактивировались активными Csk. 1/3 активные SFK аутофосфорилировались и становились 2/3 активными SFK. Активные CD148 выступали в роли отрицательных регуляторов данных процессов. Все формы активных SFK регулировали активацию CD148, Csk и Syk. Активные Syk также активировали неактивные Syk. Модуль тирозинкиназ (В): после формирования кластера CLEC-2, активные Syk фосфорилировали hemITAM в цитоплазматических доменах CLEC-2. Неактивные Syk или 2/3 активные SFK связывались с фосфорилированными hemITAM последовательностями своими SH-2 доменами и становились активными. Активные Syk активировали TULA-2 фосфатазы, которые инактивировали Syk. Модуль LAT-PLC $\gamma$ 2 (Г):

активные Syk фосфорилировали адаптерный белок LAT. PLC $\gamma$ 2 и PI3K присоединялись к фосфо-LAT, что активировало PI3K. Активные PI3K фосфорилировали PIP2, производя PIP3, который являлся докинг-сайтом для Vtk. Vtk активировались при связывании с PIP3 и активировали PLC $\gamma$ 2. Активные PLC $\gamma$ 2 гидролизуют PIP3 и производили IP3. Кальциевый модуль (Д): IP3 активировал IP3R на поверхности ЭПР тромбоцита. Через активный IP3R свободные ионы кальция попадали в цитозоль. С другой стороны, Ca<sup>2+</sup> ингибировал IP3R, а также возвращался в ЭПР через насосы SERCA. Синими линиями обозначены реакции, голубыми – ферментативный катализ. Количества активных Syk (Е), LAT (F) и PLC $\gamma$ 2 (Ж) были соотнесены с экспериментальными данными по фукоидан-индуцированной сигнализации тромбоцитов.

### **1.1.6. Разработка метода *ex vivo* исследования взаимодействия тромбоцитов и нейтрофилов**

Был разработан метод для оценки взаимодействия иммунной системы и системы гемостаза *ex vivo*. Было получено, что в присутствии ионов кальция в крови (взятие крови доноров на гирудин), а также при небольших скоростях сдвига (не более 100 с<sup>-1</sup>), на фибриллярном коллагене (Chrono-log ChronoPar) происходит роллинг и адгезия нейтрофилов. Нейтрофилы активно движутся между тромбами, с течением времени собирая аннексин V положительные тромбоциты (Рисунок 10). Было получено, что взаимодействие с тромбоцитами происходит за счёт активированных интегринов Mac1 нейтрофилов. Также, с течением времени, большинство нейтрофилов замедлялось и распластывалось, переходя в сильно активированное состояние.

Активация нейтрофилов миелопероксидазой, фукоиданом, липополисахаридами (ЛПС) или лактаферрином приводили к увеличению скорости движения нейтрофилов. ЛПС также приводили к увеличению количества сильно активированных клеток. При исследовании крови, очищенной от плазмы крови, было получено отсутствие адгезии нейтрофилов к коллагену и тромбам. При добавлении фибриногена нейтрофилы адгезировали к тромбам, однако, не «спускались» на коллаген. При добавлении фактора фон Виллебранда, нейтрофилы спускались на коллаген, однако, их количество было уменьшено по сравнению с цельной кровью. Наконец, при добавлении фибриногена и фактора фон Виллебранда одновременно, роллинг, адгезий и спуск нейтрофилов не были изменены по отношению к здоровым донорам.

В результате сравнения скоростей и количества, а также процента сильно активированных нейтрофилов у пациентов с иммунологическими заболеваниями

(синдром Вискотта-Олдрича – СВО) и здоровых доноров, было получено увеличенное количество сильно активированных клеток у пациентов с СВО.

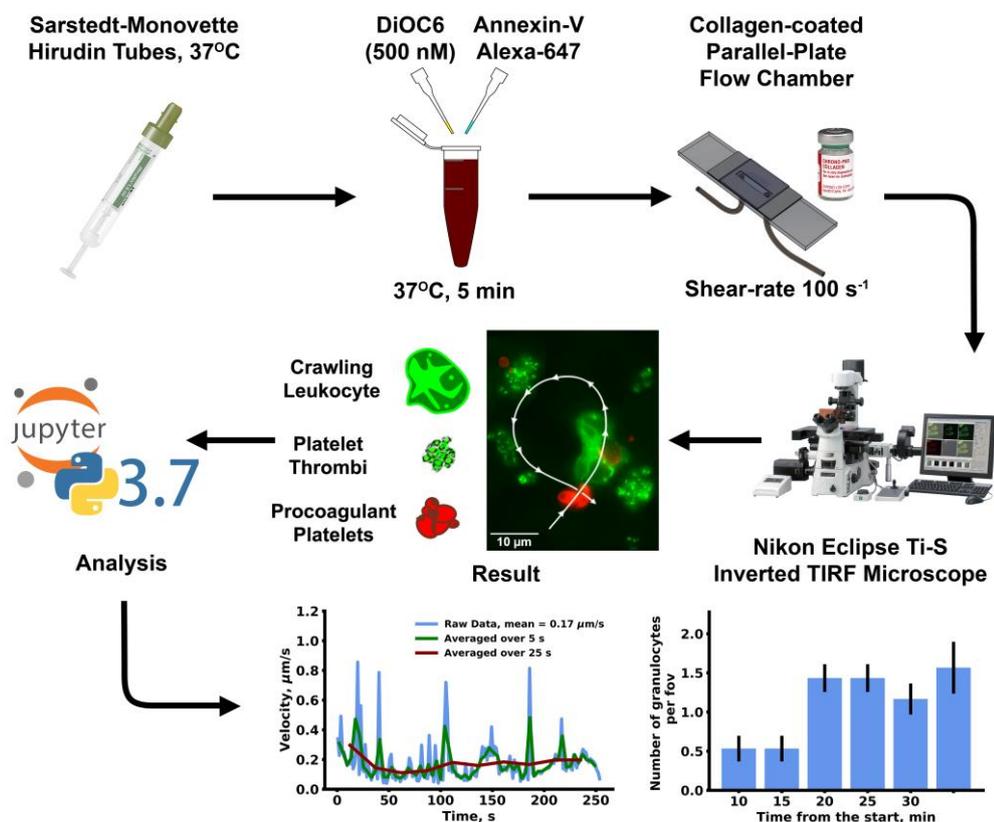


Рисунок 10. Схема комбинированного теста иммунитета и системы гемостаза. Кровь доноров была взята в вакуумные пробирки, содержащие гирудин. Затем кровь в течение 5 минут была окрашена DiOC6 (для визуализации клеток) и флуоресцентно меченным аннексином V (для визуализации фосфатидилерин положительных клеток). Окрашенная кровь прокачивалась со скоростью  $100 \text{ c}^{-1}$  через плоскопараллельную проточную камеру, на которую нанесён фибриллярный коллаген. Образцы анализировались посредством флуоресцентной микроскопии. Затем полученные результаты были обработаны с использованием Python 3.7. В качестве результатов исследования рассматривались скорость движения клеток, их количество в зависимости от времени и количество сильно активированных клеток.

### 1.1.7. Исследование кальциевой сигнализации тромбоцитов с помощью проточной цитометрии

Для исследования взаимодействия внутриклеточной сигнализации и функциональной активности тромбоцитов был разработан тест, основанный на методе проточной цитометрии. Кровь здоровых доноров была взята в вакуумные пробирки, содержащие гирудин. Затем кровь была окрашена чувствительным к концентрации

свободных ионов кальция флуорофором Fura-RED. После инкубации в течение 35 минут при 37°C, богатая лейкоцитами и тромбоцитами плазма (LRP) отбиралась от осевших эритроцитов и разводилась в буфере Тирода до финальной концентрации тромбоцитов 1000 тромб./мл. После этого тромбоциты инкубировались при 37°C в течение 35 минут. Затем к тромбоцитам добавлялись флуоресцентно меченные фибриноген и аннексин-V и полученные образцы исследовались посредством проточной цитометрии в кинетическом режиме (Рисунок 11 А).

Тромбоциты были выделены на диаграмме FSC-SSC. Также были выбраны аннексин-V отрицательные клетки, не связавшие фибриноген (Рисунок 11 Б, В). Полученные сигналы свободной и связанной с кальцием Fura-RED были усреднены, а затем, взято их отношение (Рисунок 11 Г-Е). По формуле Гринкевича:

$$[Ca_{Free}^{2+}] = K_D^{FuraRED} \times \frac{FI_{max}}{FI_{min}} \times \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R}$$

где  $K_D^{FuraRED}$  – KD Fura-RED к свободным ионам кальция,  $FI_{max}$  – максимальная интенсивность флуоресценции свободной Fura-RED,  $FI_{min}$  – минимальная интенсивность флуоресценции свободной Fura-RED,  $R$  – отношение флуоресценции связанной с кальцием к свободной Fura-RED,  $R_{max}$  – максимальное отношение,  $R_{min}$  – минимальное отношение. Для дополнительной калибровки концентрации кальция, образцы были инкубированы с 10 мМ EGTA, а затем рассчитана концентрация кальция в среде аналогично (3).

Максимально достижимые концентрации кальция, а также максимальное связывание фибриногена, изменение бокового светорассеяния (изменение формы) и доля аннексин-V положительных клеток были использованы для оценки функционального состояния тромбоцитов. Посредством данного метода было получено увеличение концентрации кальция в покоящихся тромбоцитах пациентов с СВО, а также пониженное связывание фибриногена у пациентов с иммунной тромбоцитопенией.

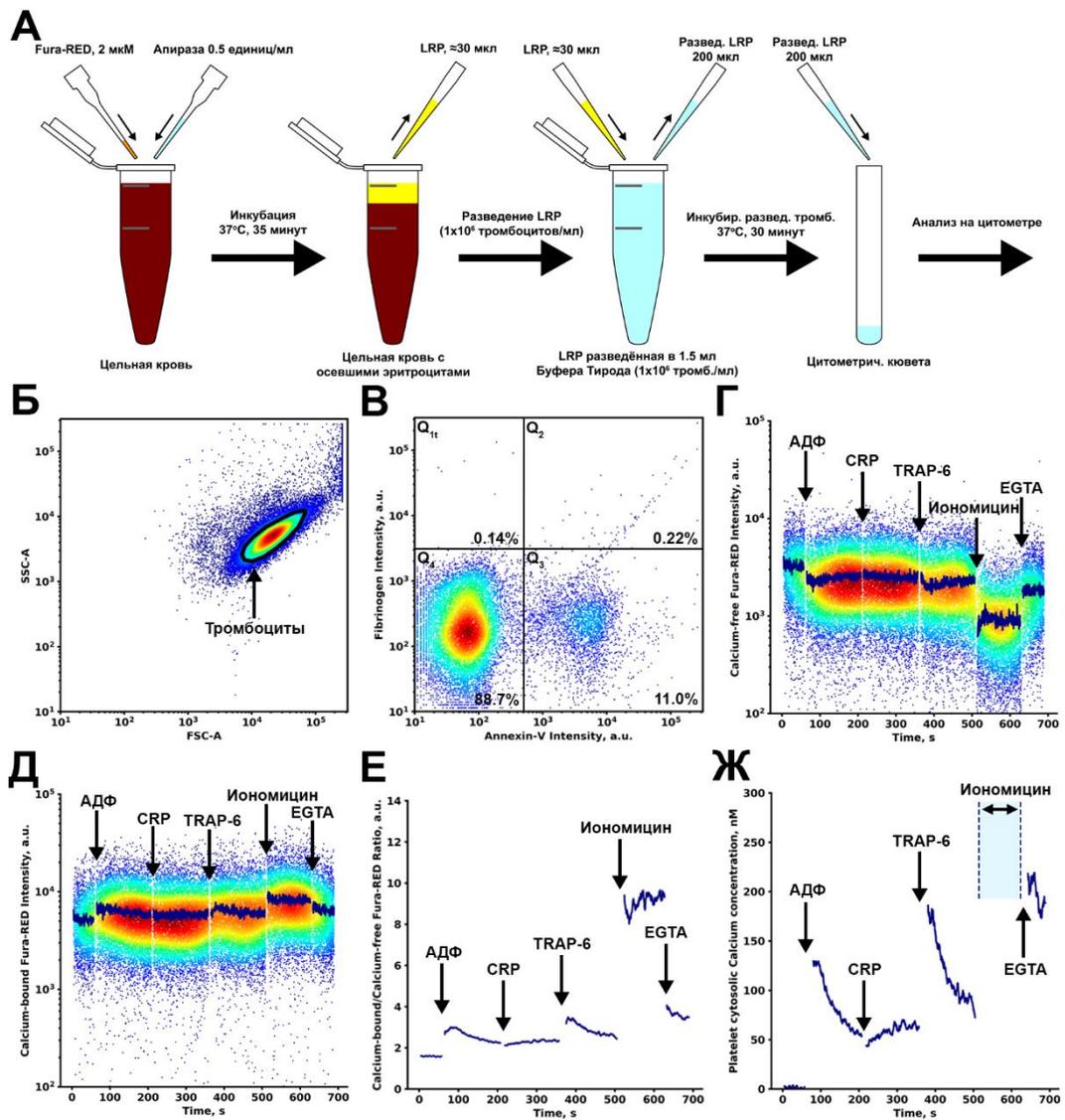


Рисунок 11. Схема анализа кальция в тромбоцитах методом проточной цитометрии. Кровь доноров была взята на в вакуумные пробирки с гирудином и окрашена 2 мкМ Fura-RED в присутствии 0,5 ед/мл апиразы. После инкубации в течение 35 минут при 37оС богатая лейкоцитами плазма (LRP) была отобрана от осевших эритроцитов и разведена в буфере Тирода с кальцием до концентрации тромбоцитов  $1 \times 10^3$  тромб/мл. Разведённые тромбоциты были проинкубированы в течение 30 минут при 37°C и затем проанализированы на проточном цитометре (А). Область тромбоцитов была выбрана на диаграмме FSC-SSC (Б), затем были отделены аннексин-V-отрицательные клетки, не связавшие фибриноген (В). Затем были усреднены сигналы свободной и связанной с кальцием Fura-RED (Г и Д, соответственно). Отношение сигналов (Е) было пересчитано в концентрацию кальция (Ж) посредством формулы Гринкевича.

### 1.1.8. Компьютерная модель активации комплекса внешней теназы на поверхности везикул

Было показано, что ферментативный комплекс внешней теназы (VIIa/TF) формируется при посадке на тканевый фактор фактора VIIa напрямую из раствора. Было показано, что предпочтительным субстратом комплекса VIIa/TF является мембранно-связанный фактор X. Было выдвинуто предположение, что при различных поверхностных плотностях тканевого фактора скорость реакции лимитирована различными стадиями данной реакции. Была выдвинута гипотеза, что связывание фактора X и фактора Xa с фосфолипидной мембраной являются диффузионно-лимитированными процессами, а также предложены постановки экспериментов для проверки этой гипотезы.

Типичные уравнения для связывания факторов с мембраной в гомогенной модели:

$$\begin{aligned} \frac{d[X]}{dt} &= -k_{on}^X \cdot [X] \cdot \frac{[Lip]}{NX} + k_{off}^X \cdot [X^B] \\ \frac{d[X^B]}{dt} &= k_{on}^X \cdot [X] \cdot \frac{[Lip]}{NX} - k_{off}^X \cdot [X^B] \end{aligned}$$

где [X], [XB] и [Lip] – концентрации фактора X в растворе, на фосфолипидной мембране и концентрация фосфолипидов, NX – число молекул фосфолипида, необходимое для связывания одной молекулы фактора X.  $k_{on}^X$  (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) – кинетическая константа связывания фактора X с мембраной;  $k_{off}^X$  (с<sup>-1</sup>) – кинетическая константа диссоциации фактора X и мембраны.

Типичное уравнение для взаимодействия мембранно-связанных белков:

$$\begin{aligned} \frac{d[VIIa/TF/Xa/Lip]}{dt} &= - \left( k_d^{VIIa/TF/Xa/Lip} \cdot [VIIa/TF/Xa/Lip] \right) + \\ &+ k_a^{VIIa/TF/Xa^B} \cdot [Xa^B] \cdot [VIIa/TF] \end{aligned}$$

где [VIIa/TF] – концентрация комплекса внешней теназы, [VIIa/TF/Xa/Lip] – концентрация тройного комплекса внешней теназы и мембранно-связанного фактора Xa, [XaB] – концентрация мембранно-связанного фактора Xa.  $k_d^{VIIa/TF/Xa/Lip}$  (с<sup>-1</sup>) – кинетическая константа диссоциации для распада комплекса VIIa/TF/Xa/Lip с образованием связанного с мембраной фактора Xa,  $k_a^{VIIa/TF/Xa^B}$  (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) – кинетическая константа связывания мембранно-связанного фактора Xa с ферментом внешней теназой.

Результаты данной работы вносят вклад в понимание механизмов протекания мембранно-зависимой реакции активации фактора X ферментативным комплексом внешней теназой. Разработанная математическая модель может быть использована для тестирования *in silico* новых ингибиторов внешней теназы а также лечебных и профилактических препаратов для медицины и определения степени их влияния на каждую стадию реакции активации фактора X ферментативным комплексом внешней теназой (Рисунок 12).

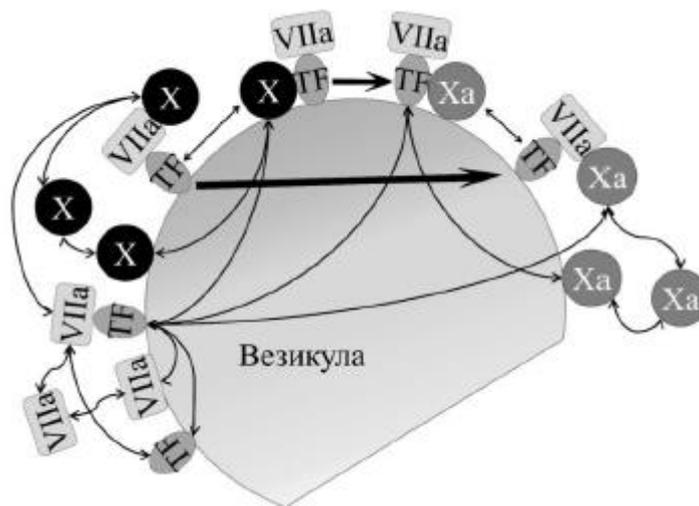


Рисунок 12. Предполагаемая схема реакции ферментативного комплекса внешней теназы. TF – тканевый фактор; X/Xa/VIIa – факторы X/Xa/VIIa. Внешняя теназа формируется из тканевого фактора и фактора VIIa либо с мембраны, либо из раствора, и активирует фактор X через образование тройного комплекса.

### 1.1.9. Исследования механизмов регуляции пространственного фибринолиза в условиях потока в области сложной геометрии

Критическим элементом в физиологическом ответе крови на повреждение сосудов является последовательный переход жидкость-гель-жидкость, который определяется образованием разветвленных полимеров молекул фибрина, а затем путем их деградации для восстановления исходного состояния сосудистой системы. Сгустки фибрина также могут образовываться внутри сосудов в результате патологических процессов и, таким образом, приводить к тромбозу, который в конечном итоге может привести к инфаркту миокарда или ишемическому инсульту. Фибринолитическая система представляет собой сеть биохимических реакций в плазме крови, которая функционирует для разрушения фибринового сгустка, когда он нежелателен или когда он больше не нужен. Процесс лизиса инициируется тканевым активатором плазминогена (ТПА). Основой этой сети

также является каскад с петлями положительной обратной связи, который в конечном итоге превращает неактивный предшественник фермента плазминоген в сериновую протеазу плазмин, способную расщеплять молекулы фибрина. Критическим триггером и кофактором лизиса является сам фибрин, который связывает плазмин и защищает его от инактивации с помощью альфа-2-антиплазмина и альфа-2-макроглобулина. Он также связывает как плазминоген, так и ТПА, что ускоряет активацию плазминогена ТПА на три порядка и защищает ТПА от инактивации ингибитором активатора плазминогена 1 (РАI-1).

Из-за низкой скорости секреции ТПА физиологический масштаб фибринолиза составляет десятки часов. Одним из основных терапевтических подходов к лечению опасных тромбов, тромбов, которые блокируют кровоток в важнейших сосудах и вызывают ишемический инсульт или инфаркт миокарда, является инъекция ТПА в высоких концентрациях. Для ишемических инсультов это лечение должно быть выполнено в течение трех часов после окклюзии сосуда и имеет успех менее 50%. Непонятно, почему некоторые сгустки оказываются устойчивыми к лизису. Одной из основных проблем при разработке и применении новых стратегий лечения является недостаточное понимание регуляции основных процессов. Фибринолиз является сложным пространственно-неоднородным явлением, и транспортные процессы, а также кинетика нелинейных реакций с петлями обратной связи могут существенно усложнить реакцию системы.

Чтобы исследовать основные механизмы этой регуляции, мы моделировали растворение терапевтического фибринового сгустка с использованием математической модели, в которой пространственно-неоднородный лизис предварительно образовавшегося сгустка в сосуде индуцировался ТРА, способным проникать в него посредством диффузии и адвекции. Анализ вклада различных реакций и участников системы фибринолиза производился при помощи анализа чувствительности и последовательной редукции модели.

Редукция детальной модели (12 уравнений в частных производных) до гораздо меньшего набора (2 уравнения в частных производных, 3 общих дифференциальных уравнения, 1 уравнение связи) подчеркивает основные регулирующие процессы пространственного лизиса фибринового сгустка: диффузия тканевого активатора плазминогена (ТПА) в сгусток и активация связанного со сгустком плазминогена регулируют распространение лизиса.

Распределение ТПА внутри сгустка при лизисе показано на Рисунке 13. Мы обнаружили, что в отсутствие потока ТПА на границе твердого сгустка и жидкой плазмы

более чем в 10 раз ниже концентрации ТПА вне сгустка. При наличии потока эти различия уменьшались и составляли примерно 3 раза.

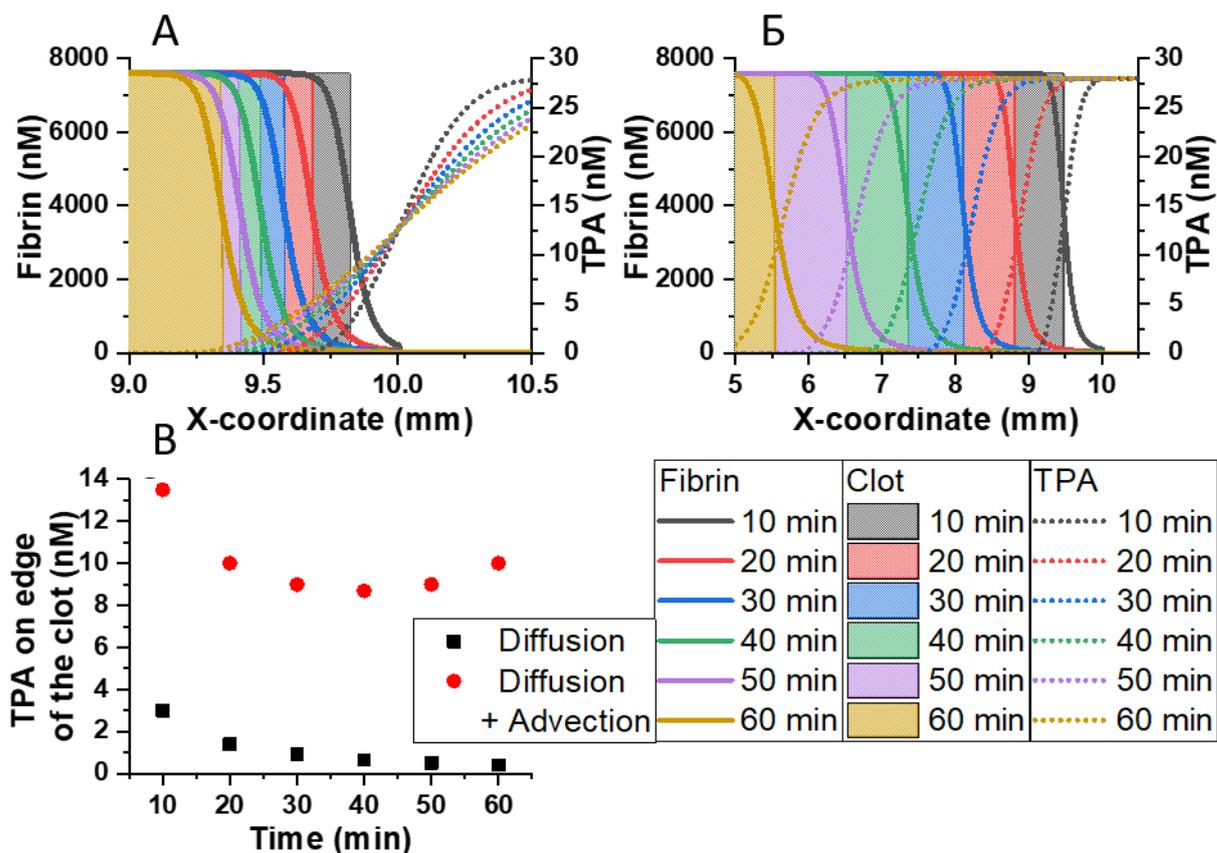


Рисунок 13. Динамика лизиса фибринового сгустка при отсутствии потока (А) или при наличии потока (Б). Распределение фибрина (сплошные линии) и распределение ТПА (пунктирные линии) показаны для каждых 10 минут моделирования. Заполненная область представляет текущий размер сгустка (то есть область, где концентрация фибрина выше 50% от начальной). (В) концентрация ТПА на краю твердого сгустка при отсутствии потока (черный) и при наличии потока (красный). Концентрация ТПА вне сгустка составляла 30 нМ. Перепад гидростатического давления составлял 100 Па, проницаемость сгустка составляла 10-13 м<sup>2</sup>.

Мы обнаружили, что PAI-1 ингибирует лизис и делает переходную зону из твердого сгустка в жидкость (ширина фронта лизиса) более узкой (Рисунок 14), но с увеличением разницы гидростатического давления этот эффект уменьшается.

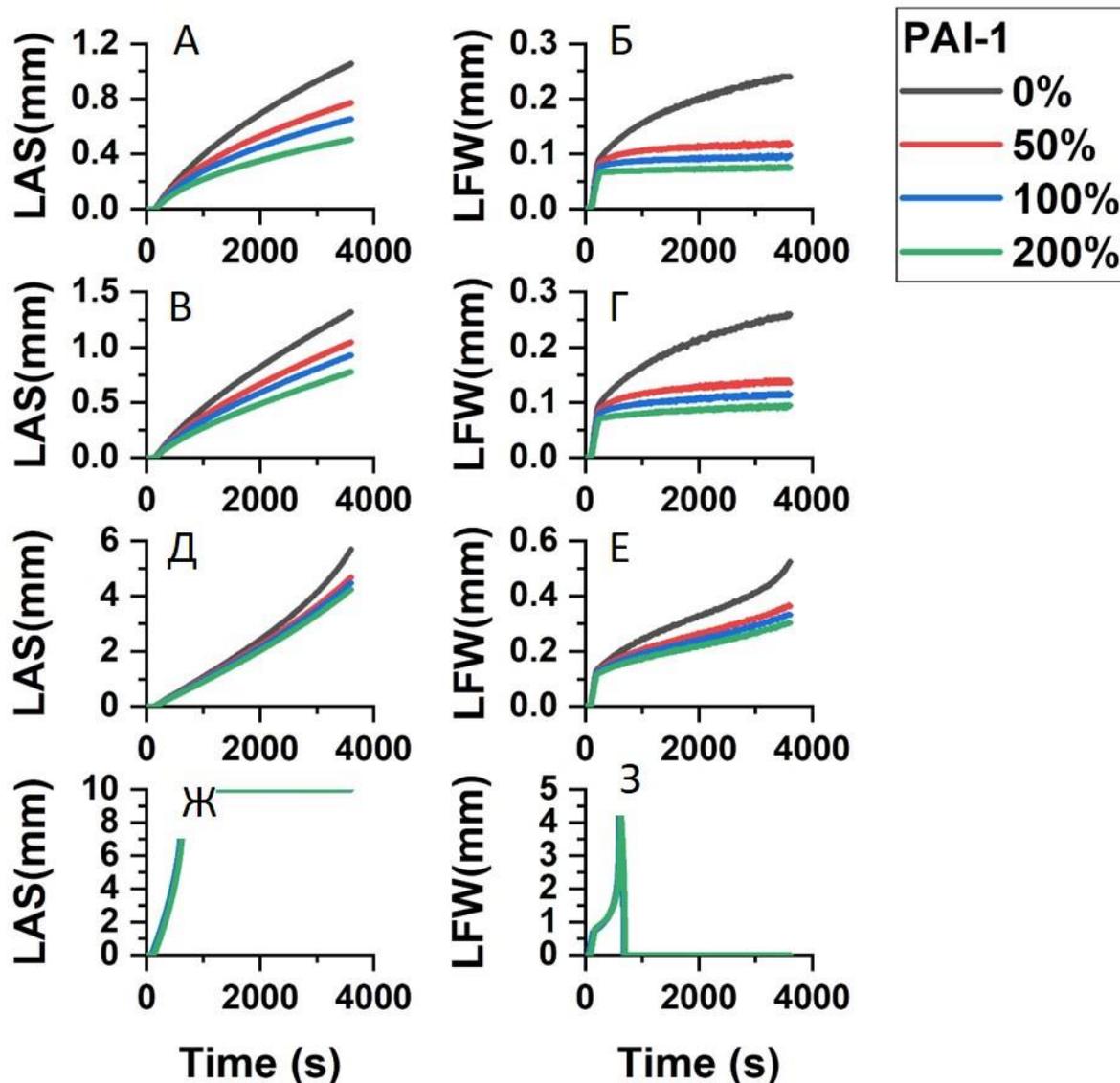


Рисунок 14. Влияние PAI-1 на пространственный лизис сгустка зависит от физических условий. Размер области лизиса (А, В, Д, Ж) и ширина фронта лизиса (Б, Г, Е, З) показаны. Концентрация PAI-1 составляла 0 нМ (черные линии), 1 нМ (50% от нормы) (красные линии), 2 нМ (100% от нормы) (синие линии) или 4 нМ (200% от нормы) (голубые линии). Моделирование проводилось для условий отсутствия потока (А, Б); с потоком при перепаде гидростатического давления 10 Па (С, Д), 100 Па (Е, F) или 1000 Па (Ж, З). Пористость фибринового сгустка составила 0.99. Проницаемость сгустка составляла 10-13 м<sup>2</sup>. Для этого моделирования использовалась уменьшенная модель лизиса фибринового сгустка в сочетании с модулем РК для ТРА. Начальная концентрация ТРА составляла 30 нМ, правое граничное условие для притока ТРА составляло 30 нМ (время <30 минут) и 10 нМ (время > 30 минут).

Другим физическим состоянием, которое может оказать влияние на процесс лизиса сгустка, является перепуск крови через коллатеральный сосуд. Чтобы оценить этот эффект, мы провели моделирование лизиса фибринового сгустка в 3d модели.

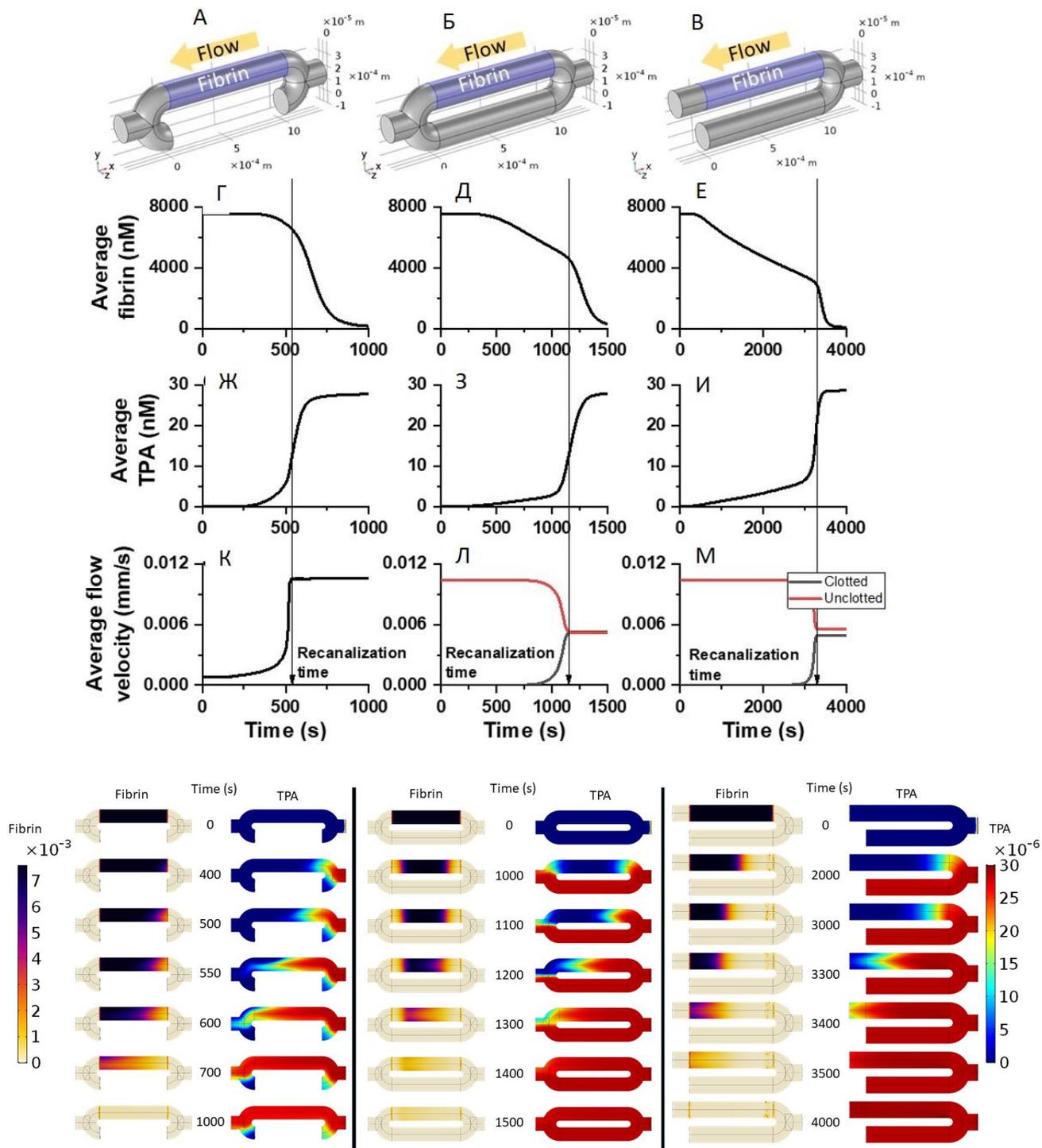


Рисунок 15. Пространственный лизис в камере с одним каналом (А), с коллатеральными каналами и одним выходом (Б) или в камере с коллатеральными каналами и отдельными выходами (В). Разница гидростатического давления составляла 10 Па, проницаемость сгустка составляла  $10^{-13}$  м<sup>2</sup>, пористость сгустка составляла 0,99.

Камера была построена из трубок диаметром 200 мкм, начальная длина фибринового сгустка составляла 1 мм. Пространственное распределение фибрина и ТРА в камере с одним каналом (А), с коллатеральными каналами и одним выходом (Б) или в камере с коллатеральными каналами и отдельными выходами (В).

Мы обнаружили, что в присутствии коллатерального потока эффективность лизиса снижалась, так как поток ТРА внутри сгустка был намного ниже, чем в случае одного сосуда. Если у нас был совместный выход для коллатеральных сосудов (Рисунок 15 Б), сгусток лизировался с обоих концов (Рисунок 15 Б), что повышало эффективность лизиса по сравнению со случаем отдельных выходов для коллатеральных сосудов (Рисунок 15 В), где происходил лизис только с одной стороны (Рисунок 15 В). В отсутствие PAI-1 время реканализации было практически нечувствительным к коллатеральному потоку, в то время как в присутствии PAI-1 в нормальной или удвоенной концентрации разница была резкой (Рисунок 16). Повышенный уровень PAI-1 в случае побочных потоков с отдельными выходами вызвал 8-кратное увеличение времени реканализации по сравнению со случаем одного канала.

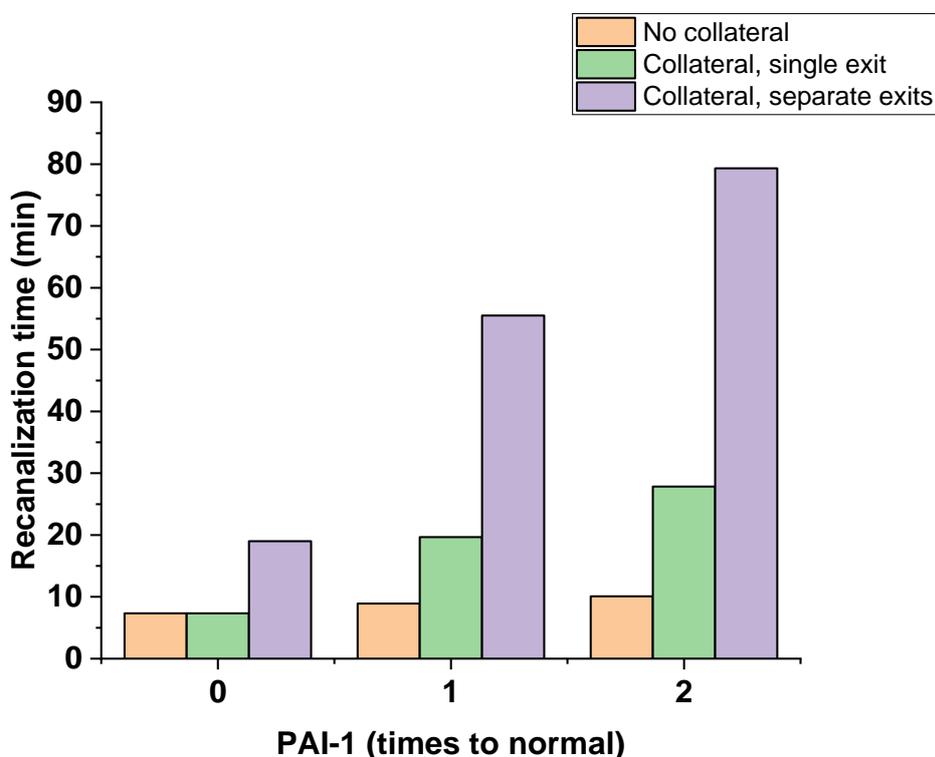


Рисунок 16. Время реканализации существенно зависит от концентрации PAI-1 в присутствии коллатеральных сосудов, особенно с отдельными выходами. Разница

гидростатического давления составляла 10 Па, проницаемость сгустка составляла 10-13 м<sup>2</sup>, пористость сгустка составляла 0,99.

#### **1.1.10. Использование системного моделирования для персонализированного подхода при коррекции гемостаза**

Нарушения свертывания крови проявляются не только как самостоятельные заболевания (например, тромбоз глубоких вен или гемофилия). Чаще они сопутствуют основному заболеванию онкологического, инфекционного характера или же проявляются при хирургических вмешательствах или гормональной терапии. В основном коррекция гемостаза проводится по стандартным протоколам, когда антикоагулянт (при наличии тромботических осложнений) или препарат, усиливающий гемостаз (при наличии коагулопатий) дозируются исходя из веса пациента. Однако такой подход не всегда дает желаемый результат, так как не учитывает индивидуальные особенности пациента, такие как различная чувствительность к препарату, разное стартовое состояние системы гемостаза, различие в фармакокинетике.

Одним из направлений персонализации медицины, призванным повысить ее экономическую эффективность, является использование компьютерных моделей свертывания.

Преимущество такого подхода состоит в том, что, проведя первичный анализ состояния системы гемостаза пациента и выяснив его индивидуальные особенности, при помощи компьютерной модели свертывания крови можно предсказать, как различные лекарства будут сдвигать баланс гемостаза в сторону гипо- или гиперкоагуляции. Это позволит уменьшить количество проводимых тестов (уменьшить стоимость лечения), уменьшить количество взятия образцов крови и исключить или минимизировать этап подбора препарата и его дозы (улучшить качество жизни пациента).

Мы разработали метод составления фармакодинамического профиля лекарства на примере низкомолекулярного гепарина. На базе ГКБ 64 были собраны образцы крови пациентов, проходящих терапию НМГ. У них была измерена концентрация основных факторов свертывания, почечный клиренс. Концентрация НМГ была изменена напрямую при помощи теста анти-Ха активности. Был составлен коагуляционный профиль пациента и индивидуальный фармакокинетический профиль НМГ, на основе этих данных смоделирован фармакодинамический профиль НМГ и результаты моделирования сопоставлены с результатами тестов гемостаза.

При измерении анти-Ха активности в образцах крови пациентов обнаружилось, что по кинетике клиренса НМГ пациентов можно разбить на 2 группы (Рисунок 17): тех, у кого за 9 часов концентрация гепарина падала более чем на 60% от максимальной (измеренной в точке 1), и те, у кого концентрация гепарина падала менее чем на 60% от максимальной за то же время.

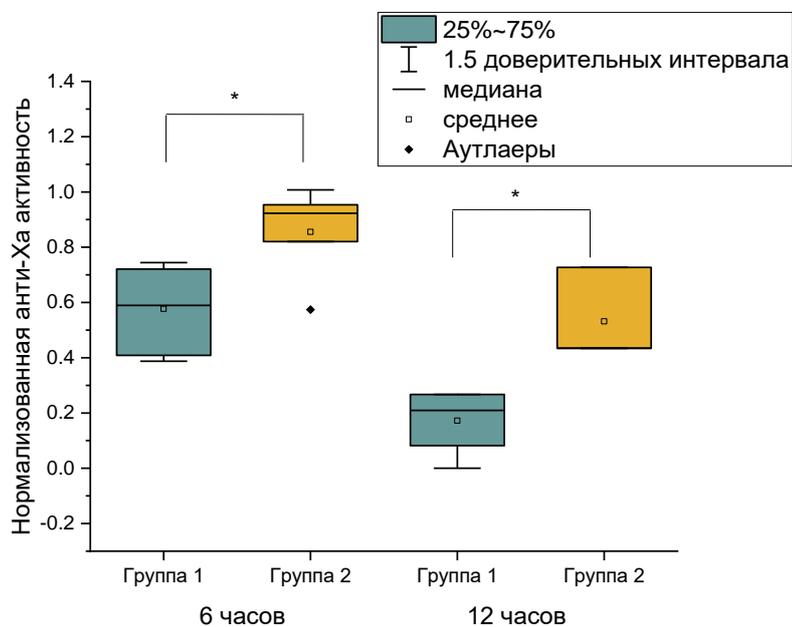


Рисунок 17. Нормализованная анти-Ха активность. Измеренная анти-Ха активность нормализовалась на уровень антитромбина (тем самым определялся уровень гепарина в образце). За 100% для каждого пациента брался уровень в точке 3 часа. Группа 1 и группа 2 отличается с достоверностью 0,05 (тест Манн-Уитни).

Клиренс НМГ в группе 1 достоверно выше, чем в группе 2 (тест Манн-Уитни,  $p=0.05$ ). По результатам сопоставления данных пациентов, выяснилось, что в группе 1 общий холестерин был достоверно ниже, чем в группе 2 (Рисунок 18) (тест Манн-Уитни,  $p=0.05$ ).

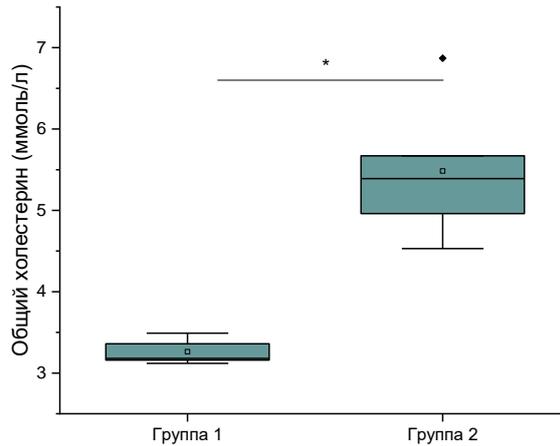


Рисунок 18. Общий холестерин в группе 1 был достоверно ниже, чем в группе 2 (тест Манн-Уитни,  $p=0.05$ ).

Существующие фармакокинетические модели НМГ являются популяционными (т.е. не учитывают индивидуальные особенности пациентов). По литературным данным основной способ выведения НМГ из организма – это почечный клиренс. Однако, существуют данные, что гепарин может связываться с апопротеинами на липидах очень низкой плотности. При разработке фармакокинетической модели НМГ мы исходили из предположения, что клиренс НМГ зависит от уровня холестерина, но для данное предположение нуждается в дополнительной проверке на большей группе пациентов в рамках отдельного исследования.

Введение НМГ осуществляется подкожно, при этом препарат попадает сначала в интерстициальное пространство, откуда он переходит в кровоток. По аналогии с моделями, описывающими динамику изменения глюкозы в модели НМГ было рассмотрено несколько компарментов (Рисунок 19).

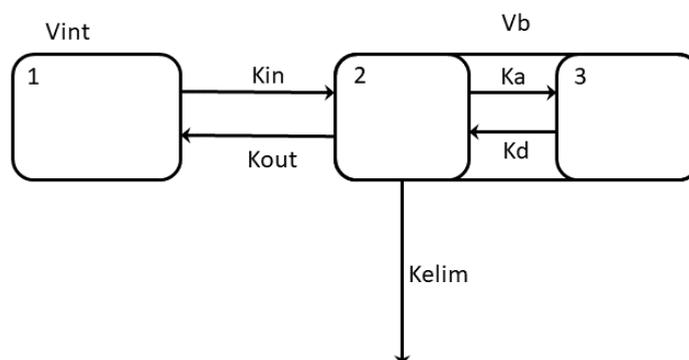


Рисунок 19. Схема фармакокинетической модели НМГ.  $V_{int}$  – интерстициальный объем.  $V_b$  – объема кровотока. Между компартаментами  $V_i$  и  $V_b$  происходит обмен, НМГ

переходит из одного в другой со скоростями, описываемыми константами  $K_{in}$  и  $K_{out}$ . Внутри компартмента  $V_b$  НМГ может находиться в одном из двух состояний: свободном (2) и связанном с липидами (3). Переход из одного состояния в другое описывается константами  $K_a$  и  $K_d$ . Свободный НМГ удаляется из кровотока со скоростью, описываемой константой  $K_{elim}$ .

НМГ при подкожном введении попадает в компартмент  $V_{int}$ . Путем обмена с компартментом  $V_b$  его концентрация в крови начинает возрастать. При этом, он частично выводится из кровотока почечным клиренсом, а частично связывается с липидами, что приводит к замедлению его выведения.

Для учета индивидуальных особенностей пациентов были введены следующие поправки.

$V_b$  – объем кровотока, высчитывался исходя из пола и значений веса и гематокрита пациента по формуле:

$$V_b = 1.4 \cdot W \cdot 0.065 \cdot (1 - HC) \text{ для женщин и}$$

$$V_b = 1.4 \cdot W \cdot 0.075 \cdot (1 - HC) \text{ для мужчин.}$$

$V_{int}$  – интерстициальный объем, высчитывался исходя из значений веса пациента по формуле:

$$V_{int} = \frac{W}{80} \cdot 6$$

Здесь  $W$  – вес пациента в килограммах,  $HC$  – гематокрит (%).

Скорость ассоциации с липидами  $K_a$  зависела от уровня холестерина

$$K_a = Chol \cdot 0.15 \cdot 10^{-5} \frac{1}{s}$$

Здесь  $Chol$  – измеренный уровень общего холестерина (ммоль/л).

Среднее время полувыведения клексана составляет 4.5-5 часов. В модели скорость выведения НМГ зависела от уровня креатинина (который описывал состояние почечного клиренса пациента):

$$K_{elim} = \left( 1 + \frac{33}{Creat} \right) \cdot 3.85 \cdot 10^{-5} \frac{1}{s}$$

Здесь  $Creat$  – измеренный уровень креатинина (мкмоль/л).

Валидация модели производилась путем сравнения результатов симуляции с измеренными значениями концентрации гепарина (Рисунок 20).

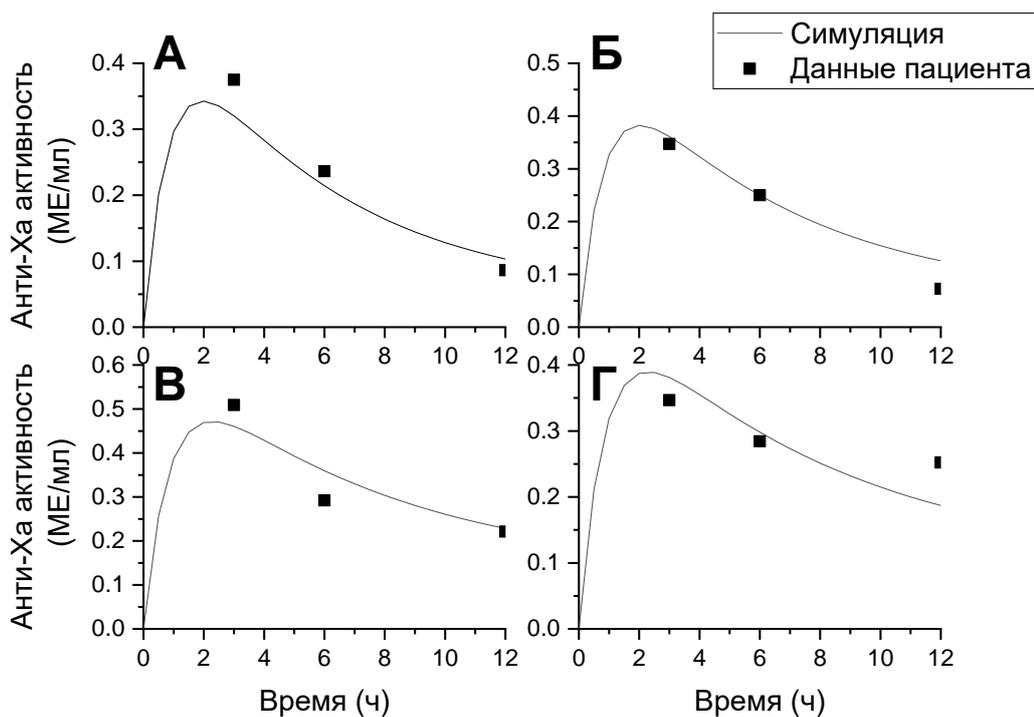


Рисунок 20. Сравнение результатов симуляции фармакокинетики НМГ и измеренных данных. (А) – пациент 1; (Б) – пациент 2; (В) – пациент 3; (Г) – пациент 4.

Пациенты 1 и 2 были из группы 1 (низкий холестерин), пациенты 3 и 4 были из группы 2 (высокий холестерин).

Для интегральной оценки состояния гемостаза пациента мы использовали тест тромбодинамика-4D.

Уровень факторов внутреннего пути свертывания мы оценивали по результату теста АЧТВ. Уровень факторов внешнего пути – по тесту ПВ.

Концентрации факторов Fg, VIII, IX, XI в модели менялась пропорционально изменению АЧТВ

$$F = F_0 \cdot \frac{31.43}{APTT}$$

F – концентрация фактора, АРТТ – значение теста АЧТВ.

Концентрации факторов II, V, VII, X менялась пропорционально изменению ПВ

$$F = F_0 \cdot \frac{12.09}{PT}$$

F – концентрация фактора, РТ – значение теста ПВ.

Удлинение АЧТВ и ПВ означает ухудшение свертывания, т.е. может свидетельствовать об уменьшении концентрации соответствующих факторов. В первом

приближении, это изменение можно считать пропорциональным отклонению величины от нормального значения.

Концентрация антитромбина измерялась напрямую.

Величина липопротеидов очень низкой плотности изменялась пропорционально изменению величины ЛПНП.

Концентрация НМГ в образце вычислялась при помощи фармакокинетической модели.

Была разработана и валидирована фармакодинамическая модель НМГ, учитывающая индивидуальные особенности пациентов, способная описывать состояние гемостаза, наблюдаемой в глобальном тесте тромбодинамика-4д (пространственная генерация тромбина). В данный момент модель хорошо описывает процессы, происходящие на ранних этапах теста (менее 45 минут) (Рисунок 21).

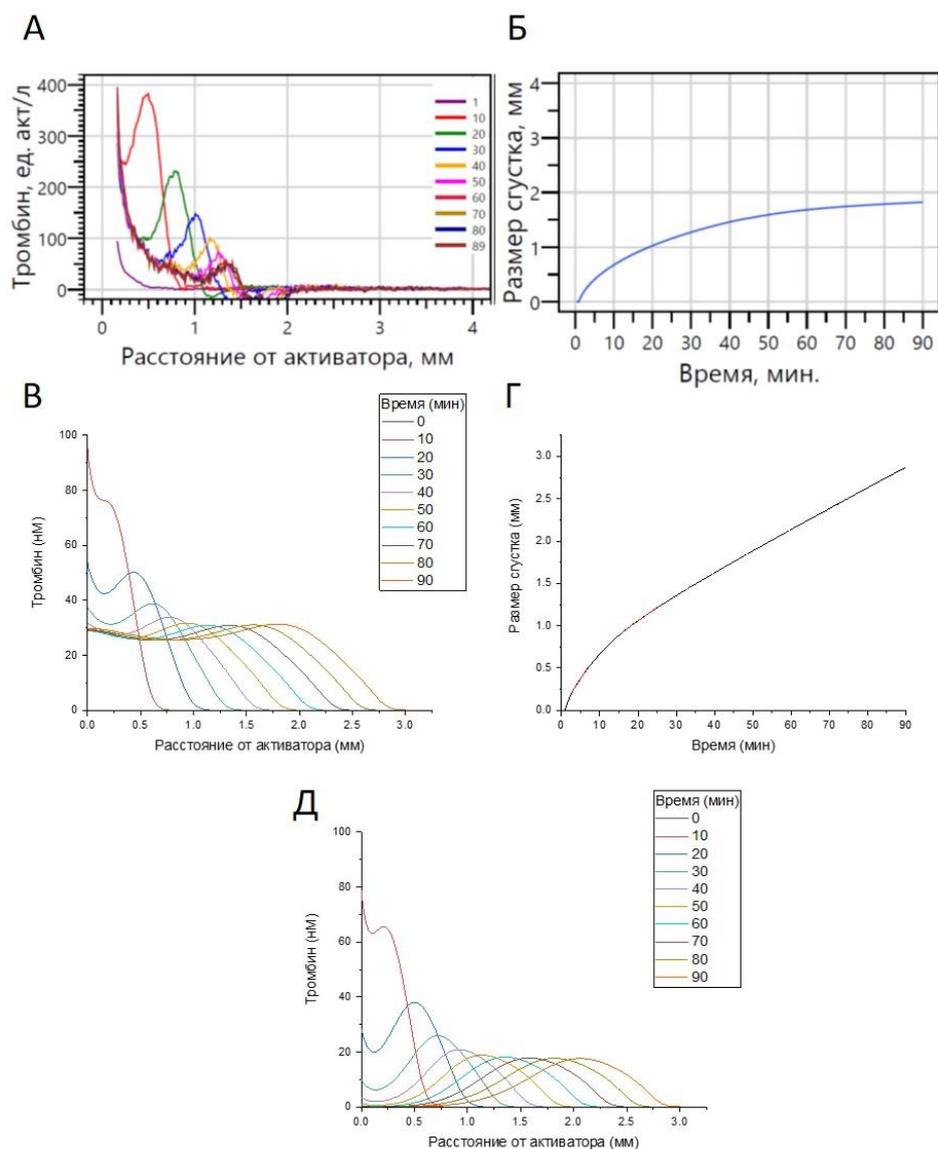


Рисунок 21. Сравнение теста тромбодинамика-4Д и результатов симуляции для пациента 2, образец 1 (3 часа после введения НМГ). А – Профили тромбина в эксперименте. Б – размер сгустка от времени в эксперименте. В – профили свободного и связанного с альфа2-макроглобулином тромбина в симуляции. Г - размер сгустка от времени в симуляции. Д - профили свободного и тромбина в симуляции.

### 1.1.11. Функциональная активность тромбоцитов у взрослых пациентов с хронической иммунной тромбоцитопенией на фоне лечения ромиплостимом

Иммунная тромбоцитопения (ИТП) - это аутоиммунное заболевание, вызванное аутоантителами к тромбоцитам. Функция тромбоцитов может быть нарушена при ИТП, что может способствовать кровотечению. Однако не все исследования подтверждают это,

и влияние новых миметиков тромбopoэтина, ромиплостима и эльтромбопага, на функцию тромбоцитов в ИТП неясно.

Мы исследовали функциональную активность тромбоцитов и ее связь с кровотечениями у 31 взрослого пациента с хронической ИТП, которым был назначен ромиплостим, в течение шести месяцев. До начала терапии ромиплостимом у 9 пациентов наблюдались геморрагические осложнения, а у 22 – не было. Количество тромбоцитов между этими двумя группами достоверно не различалось (Рисунок 22 А). Времена тромбоэластографии (параметры R и K) были увеличены, а амплитуда MA и угол  $\alpha$  уменьшены у пациентов с кровотечением по сравнению с пациентами без кровотечения (Рисунок 22 Б, В). Параметр прямого светорассеяния (FSC-H) был достоверно увеличен в тромбоцитах пациентов с ИТП по сравнению со здоровыми (Рисунок 22 Г) и был значительно выше в группе с кровотечениями. Маркеры активации тромбоцитов (CD62p для  $\alpha$ -гранул, прокоагулянтные тромбоциты) были достоверно увеличены в покоящихся тромбоцитах пациентов (Рисунок 22 Д,Е) и были выше в группе пациентов с кровотечениями. В отличие от этого, реакция активации тромбоцитов на стимуляцию агонистами рецепторов тромбина и коллагена существенно не изменялась при ИТП и не отличалась между группами с кровотечением и без.

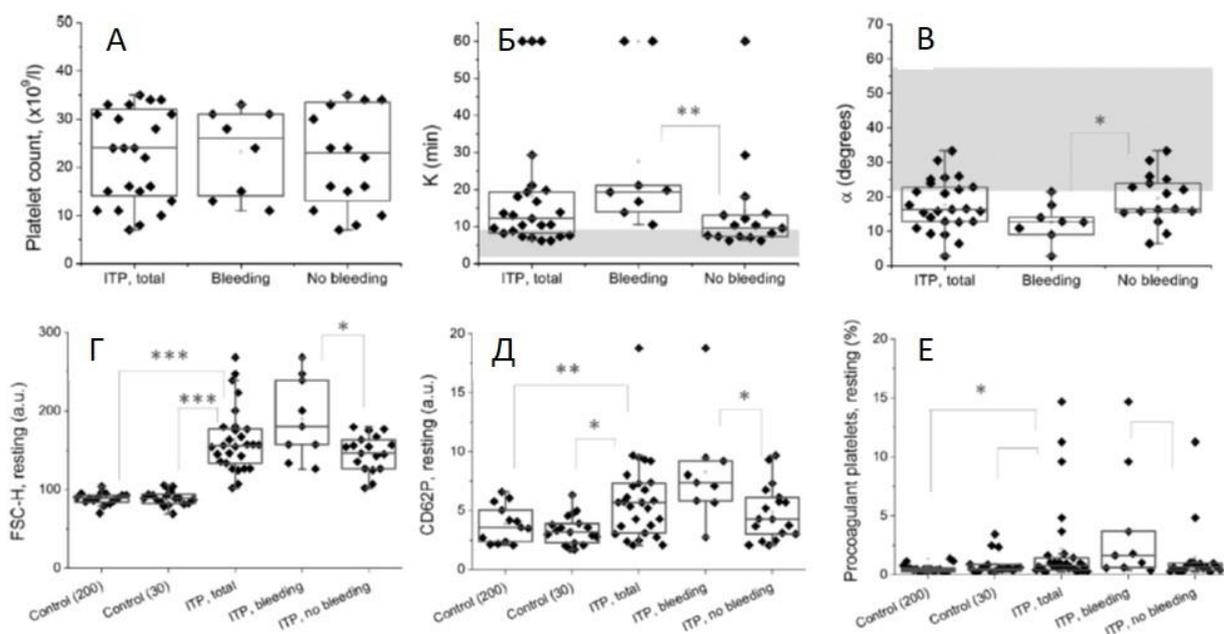


Рисунок 22. Функция тромбоцитов и кровотечения при хронической ИТП до начала лечения. Панели показывают различия в количестве тромбоцитов, параметрах ТЭГ и маркерах преактивации тромбоцитов у пациентов с кровотечениями и без. Точки данных показаны ромбами, горизонтальные линии-медианы, прямоугольники показывают 25-75 перцентилей, полосы ошибок показывают интервалы 5-95%. Статистическая

значимость - по звездочкам (три звездочки для  $p < 0,001$ , две для  $p < 0,01$ , одна для  $p < 0,05$ , нет для  $p < 0,10$ ). Серые области указывают на нормальные диапазоны.

За шесть месяцев терапии ромиплостимом функция тромбоцитов претерпела значительные изменения. Параметры размера тромбоцитов (FSC) и предварительной активации (прокоагулянтные тромбоциты) постепенно снижались до нормальных значений (Рисунок 23). Электронная микроскопия подтвердила исчезновение предварительной активации на терапии (Рисунок 23 В). У некоторых пациентов изменения параметров функции тромбоцитов и прекращение кровотечения наблюдались даже без увеличения количества тромбоцитов.

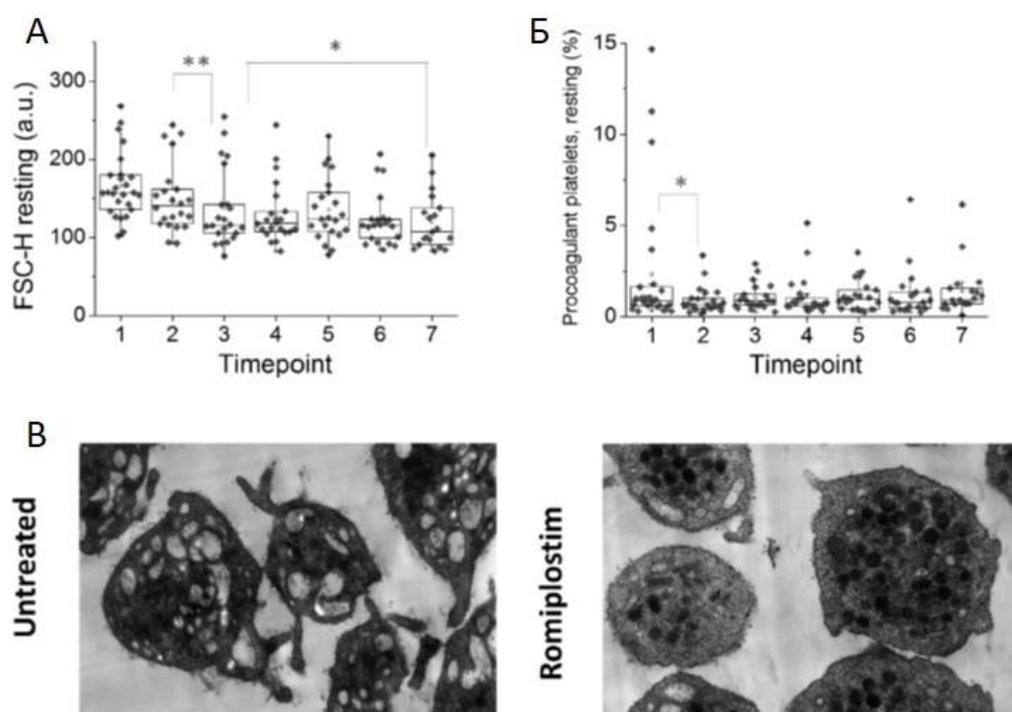


Рисунок 23. Размер и преактивация тромбоцитов на терапии ромиплостимом. (А-Б) функцию тромбоцитов оценивали один раз в месяц. В) просвечивающая электронная микроскопия образцов тромбоцитов у пациентов с ИТП до терапии ромиплостимом и на ромиплостиме.

Для определения независимых параметров функции тромбоцитов среди чувствительных к риску кровотечений мы провели корреляционный анализ, который выделил три из них: группа "тромбоэластография" (либо R, K, либо  $\alpha$ ), группа "размер тромбоцитов" (FSC-H, SSC-H, CD42b), группа "предварительная активация тромбоцитов"

(CD62P). Исходя из этого, мы разработали простой калькулятор риска кровотечения (Рисунок 24, один балл добавляется к баллу риска превышения пороговых значений К, CD62P и FSC-H 13,8, 7,5 и 170 соответственно), дающий постепенную оценку риска кровотечения с AUC 0,92±0,06, p<0,001). Для оценки полезности этого инструмента оценки риска кровотечений требуются дополнительные проспективные исследования.

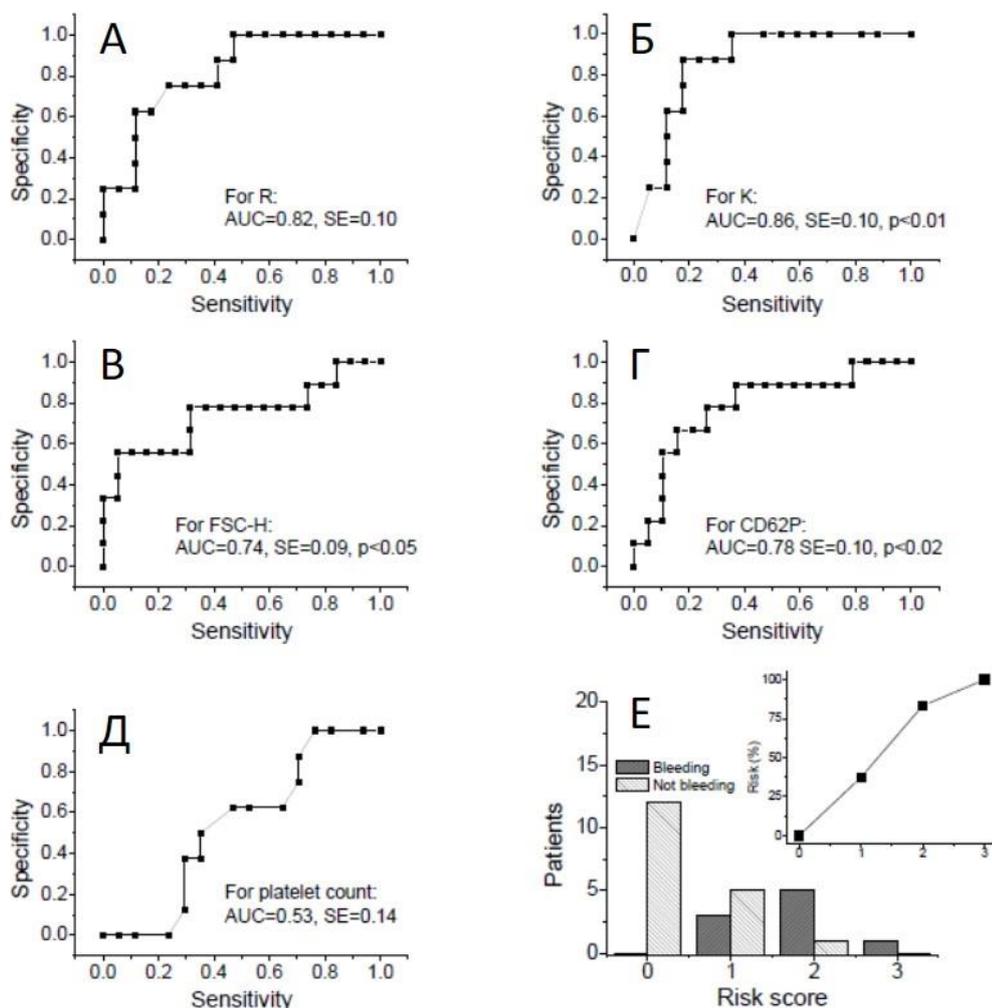


Рисунок 24. Возможность оценки риска кровотечения. Панели А-Д показывают ROC-кривые для указанных лабораторных параметров, чувствительных к риску кровотечения. Панель Е показывает распределение риска для калькулятора риска кровотечения с использованием трех параметров (добавление одного балла к баллу риска для превышения значений К, CD62P и FSC-H 13,8 мин, 7,5% и 170% соответственно).

### 1.1.12. Состояние системы свертывания у пациентов при проведении процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО)

Бесплодие у женщин часто сопровождается гиперкоагуляционным состоянием. Частота встречаемости тромбофилий и концентрации циркулирующих микровезикул выше, а активность протеина С понижены у женщин с проблемами зачатия по сравнению

с основной популяцией. Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) может усилить эти прокоагулянтные изменения у бесплодных женщин, главным образом вследствие высокодозной гормональной терапии. Гиперкоагуляция, вызванная процедурой ЭКО, может влиять на исход ЭКО; сдвиг в системе свертывания в сторону гиперкоагуляции может привести к нарушению имплантации эмбрионов и плацентарного кровообращения, что считается одной из причин бесплодия и привычного выкидыша и, следовательно, может быть причиной неудачи ЭКО. Есть некоторые доказательства того, что низкомолекулярный гепарин (НМГ) в профилактических дозах, назначаемых во время имплантации эмбрионов, увеличивает шансы на зачатие и положительный исход беременности, что также подтверждает связь между гемостазом и успехом ЭКО.

Глобальные тесты гемостаза являются информативными для оценки гиперкоагуляции у беременных. Новый глобальный тест свертывания, а именно тромбодинамика, по-видимому, подходит как для выявления гиперкоагуляции, так и для мониторинга антикоагулянтной профилактики или терапии, включая мониторинг антикоагулянтной профилактики у беременных. Однако, стоит отметить, что глобальные тесты гемостаза на настоящий момент крайне редко используются в клинической практике.

Целью исследования являлась оценка состояния свертывания с помощью стандартных тестов свертывания (активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбин по Квику, концентрация фибриногена и D-димеров) и глобального теста свертывания (тромбодинамика) у женщин с бесплодием до начала цикла ЭКО и во время лечения для выявления связи между дисбалансом свертывания и исходом программы ЭКО.

Образцы крови для мониторинга коагуляции отбирали в пять временных точек: до ЭКО (точка 1, T1) во второй день менструального цикла; через одну неделю после начала стимуляции суперовуляции (точка 2, T2); в день пункции ооцитов (пункт 3, T3); в день переноса эмбриона (точка 4, T4); и через неделю после переноса эмбриона, в день теста ХГЧ (точка 5, T5). Кровь в T5 была взята через 2-9 часов после инъекции НМГ. Образцы крови контрольной группы были получены от здоровых женщин без осложненного акушерского анамнеза.

АЧТВ, протромбин по Квику, концентрации фибриногена и D-димера проводили с использованием автоматического коагулометра ACL TOP 700 и реагентов HemosIL® (Instrumentation Laboratory, USA, MA).

Анализ тромбодинамики проводили с помощью анализатора тромбодинамики и набора тромбодинамики (ООО «ГемаКор», Россия). Этот метод основан на

фоторегистрации пространственного роста фибринового сгустка после активации свертывания на поверхности, несущей иммобилизованный тканевый фактор. Вкратце, 120 мкл плазмы добавляли в микропробирку с высушенным корн-трипсин ингибитором СТИ (0,2 мг / мл) и буфером HEPES (30 мМ, рН 7,2-7,4). После этого образец инкубировали в течение 3 минут при 37 ° С в специальной отверстии термостата анализатора. Затем в плазму добавляли высушенный ацетат кальция (20 мМ), и образец немедленно помещали в пластиковую кювету. Свертывание активировали с использованием пластиковой пластины, которая была покрыта ковалентно прикрепленным ТF (100 пмоль/м<sup>2</sup>).

Эксперименты проводились с использованием системы видеомикроскопии, которая позволяет наблюдать пространственную динамику роста фибринового сгустка. Образование фибринового сгустка было обнаружено с помощью рассеяния красного света. Рассеянный свет детектировался цифровой камерой каждые 6 секунд в течение 30 минут (Рисунок 25 А). Рассеяние света линейно связано с концентрацией фибрина. Для каждого профиля рассеяния света (Рисунок 25 Б) размер сгустка определяли как координату полумаксимальной интенсивности рассеяния света (Рисунок 25 В). Средняя площадь спонтанных сгустков как функция времени (Рисунок 25 В) была рассчитана в пределах области измерения, указанной на Рисунке 25 А (белая рамка).

Размер сгустка как функция времени использовался для расчета следующих параметров: скорости роста сгустка ( $V$ ), а именно средней скорости роста сгустка за 10-минутный интервал периода стационарного роста или до спонтанного свертывания (образование сгустков в пространстве экспериментальной кюветы, не связанных с ростом основного сгустка). С помощью этой кривой было рассчитано время спонтанного свертывания ( $T_{sp}$ ), а именно время для заполнения 5% анализируемой площади кюветы спонтанными сгустками (на практике мы использовали обратный параметр  $1/T_{sp}$ ; он был равен нулю без спонтанного свертывания). Параметр  $D$  рассчитывали как величину максимального светорассеяния от фибринового сгустка.

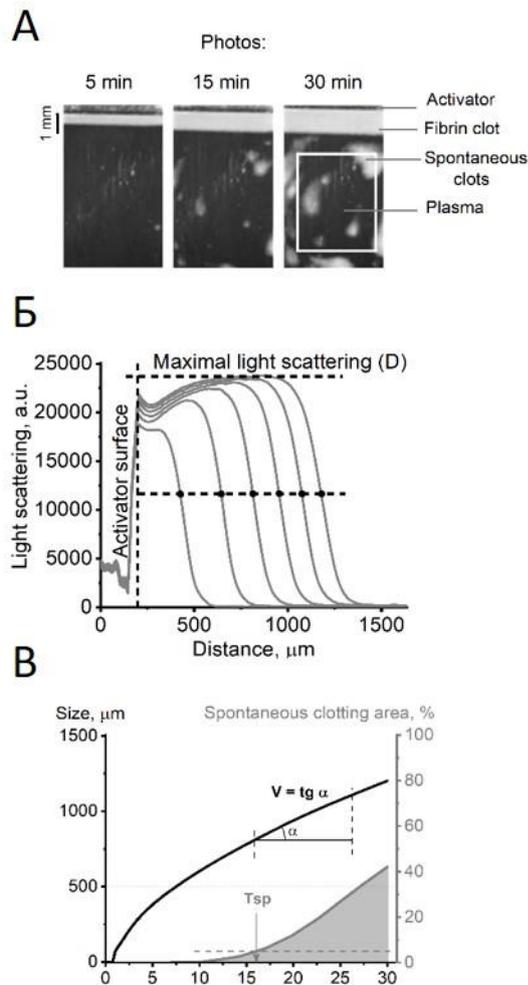


Рисунок 25. Принцип метода тромбодинамики. (А) Фотографии роста фибринового сгустка. Край активатора в верхней части снимков покрыт иммобилизованным тканевым фактором. Сгусток начинает расти от края активатора. Процесс образования фибринового сгустка регистрируется методом темного поля по светорассеянию от сгустка. Полученная серия фотографий показывает, как форма, размер и плотность фибринового сгустка изменяется со временем. Белая рамка указывает область регистрации спонтанного свертывания. (Б) Профили светорассеяния фибриновых сгустков. Координаты фронта фибрина являются координатами полумаксимальной интенсивности светорассеяния. (В) График роста сгустка в зависимости от времени, представляющий параметры  $V$  и  $T_{\text{sp}}$  тромбодинамики.

В целом, стандартные параметры гемостаза существенно не отличались между группами впоследствии забеременевших и не забеременевших пациенток (Рисунок 26).

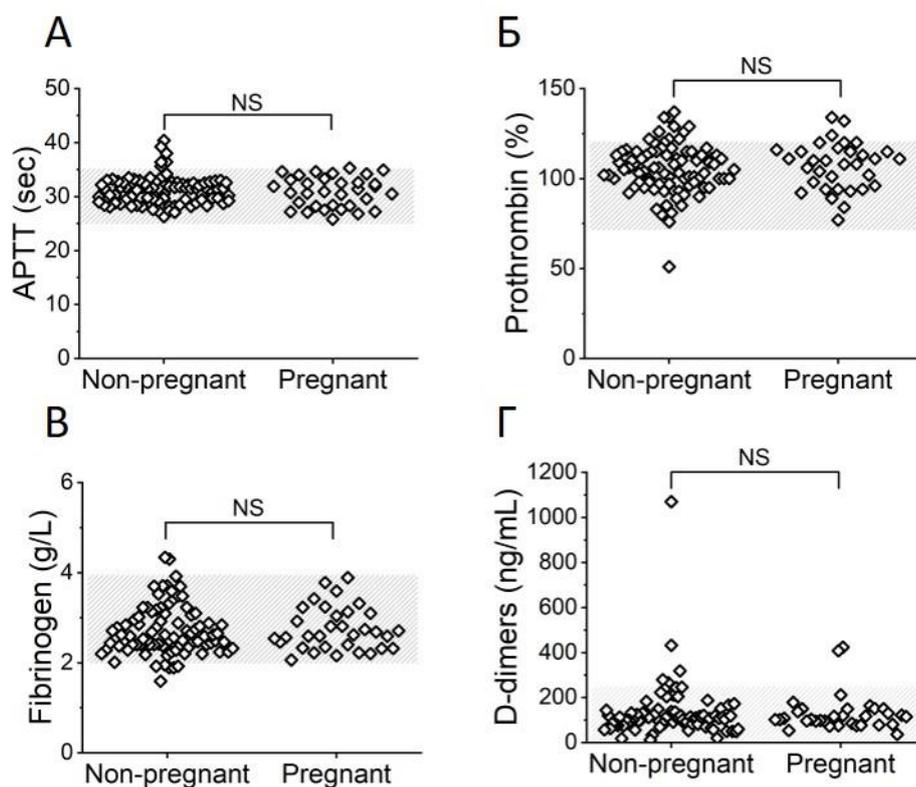


Рисунок 26. Результаты стандартных тестов гемостаза до начала программы ЭКО. (A) АРТТ, (B) протромбин, (C) фибриноген, (D) D-димеры. Заштрихованная область показывает нормальный диапазон. NS – различия недостоверны; для статистического анализа достоверности различий между незабеременевшими ( $n = 89$ ) и забеременевшими ( $n = 36$ ) женщинами использовался U-критерий Манна-Уитни.

Параметры тромбодинамики до процедуры ЭКО также достоверно не различались между незабеременевшей и забеременевшей группами или между группами, планирующими ЭКО и контрольной группой (Рисунок 27). Ни у одного из пациентов не было спонтанного свертывания. Тем не менее, мы наблюдали гиперкоагулянтный «хвост» для параметра V тромбодинамики в группе, пациентки из которой впоследствии не забеременели.

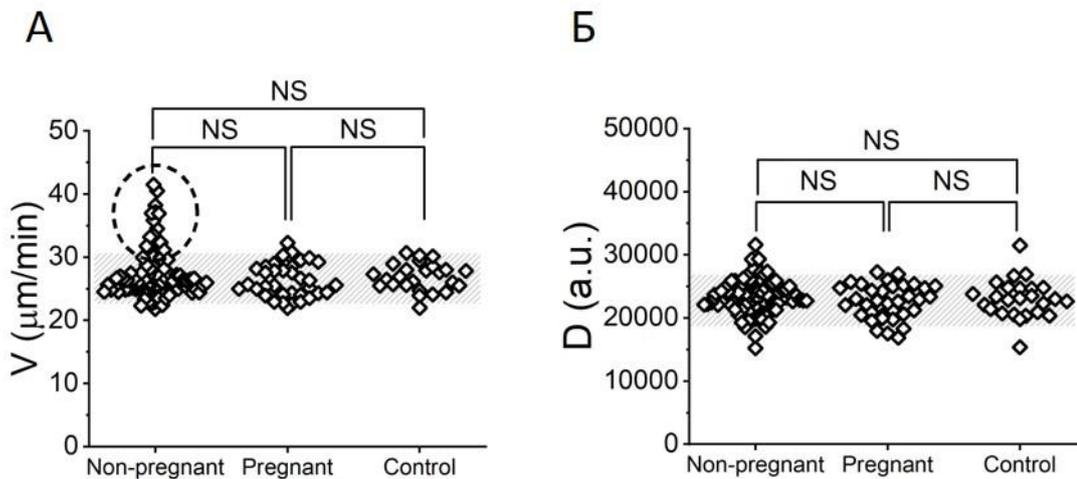


Рисунок 27. Результаты тромбодинамики пациентов до начала процедуры ЭКО. (А) V, (Б) Максимальное светорассеяние (D). Заштрихованная область показывает нормальный диапазон, рассчитанный как интервал 5-95% для контрольной группы (n = 25). NS указывает на незначительную разницу; U-тест Манна-Уитни). Пунктирной линией обозначены пациенты с гиперкоагуляцией (повышенная скорость роста сгустка V по сравнению с диапазоном норм).

ROC-анализ показал, что для параметра V в тромбодинамике оптимальное значение отсечки было 32,3 мкм/мин. Анализ соотношения рисков показал, что общий относительный риск отрицательного исхода программы ЭКО для женщин с гиперкоагуляцией ( $V > 32,3$  мкм / мин) был в 1,4 раза выше, чем для женщин с  $V \leq 32,3$  мкм / мин ( $RR_{crude} = 1,41$ ; 95% ДИ 1,20, -1,67;  $P < 0,001$ ). Мы скорректировали общий RR для потенциальных клинических факторов, а именно, возраста, ИМТ, типа бесплодия, количества предыдущих циклов ЭКО и количества извлеченных ооцитов. Эти факторы были включены, потому что они могли потенциально влиять как на исход ЭКО, так и на гемостаз. Скорректированный RR для женщин с гиперкоагуляцией до начала ЭКО был лишь незначительно снижен, так как не было значительных эффектов от дополнительных факторов ( $RR_{adj} = 1,38$ ; ДИ 1,28-1,49;  $P < 0,001$ ).

Динамика параметров свертывания во время проведения цикла ЭКО (для всех участников независимо от результата лечения ЭКО) представлена на Рисунке 28. АЧТВ значительно укорочено в Т3; однако все значения оставались в пределах нормального диапазона во все моменты времени. Протромбин значительно увеличен на протяжении всей стимуляции и был максимальным в день переноса эмбриона (Т4) с уменьшением к моменту Т5. Большинство значений остались в пределах нормы. Концентрация

фибриногена демонстрировала сходную тенденцию: она повышалась в T3 и T4 и снижалась в T5. Процент женщин с повышенным уровнем фибриногена на в T4 составил 55%. Динамика D-димеров отличалась от параметров, описанных выше; мы наблюдали небольшое снижение уровня D-димеров в T2 с последующим постепенным увеличением в T4 и T5 (в T5 процент женщин с повышенными D-димерами составил 61%). Параметры тромбодинамики продемонстрировали прогрессирование гиперкоагуляции, начиная с T2, достигая максимума в T3 (скорость роста сгустка была повышена у 60% пациентов, а спонтанное свертывание крови наблюдалось у 38% пациентов), а затем происходила нормализация гемостаза в T4 и T5.

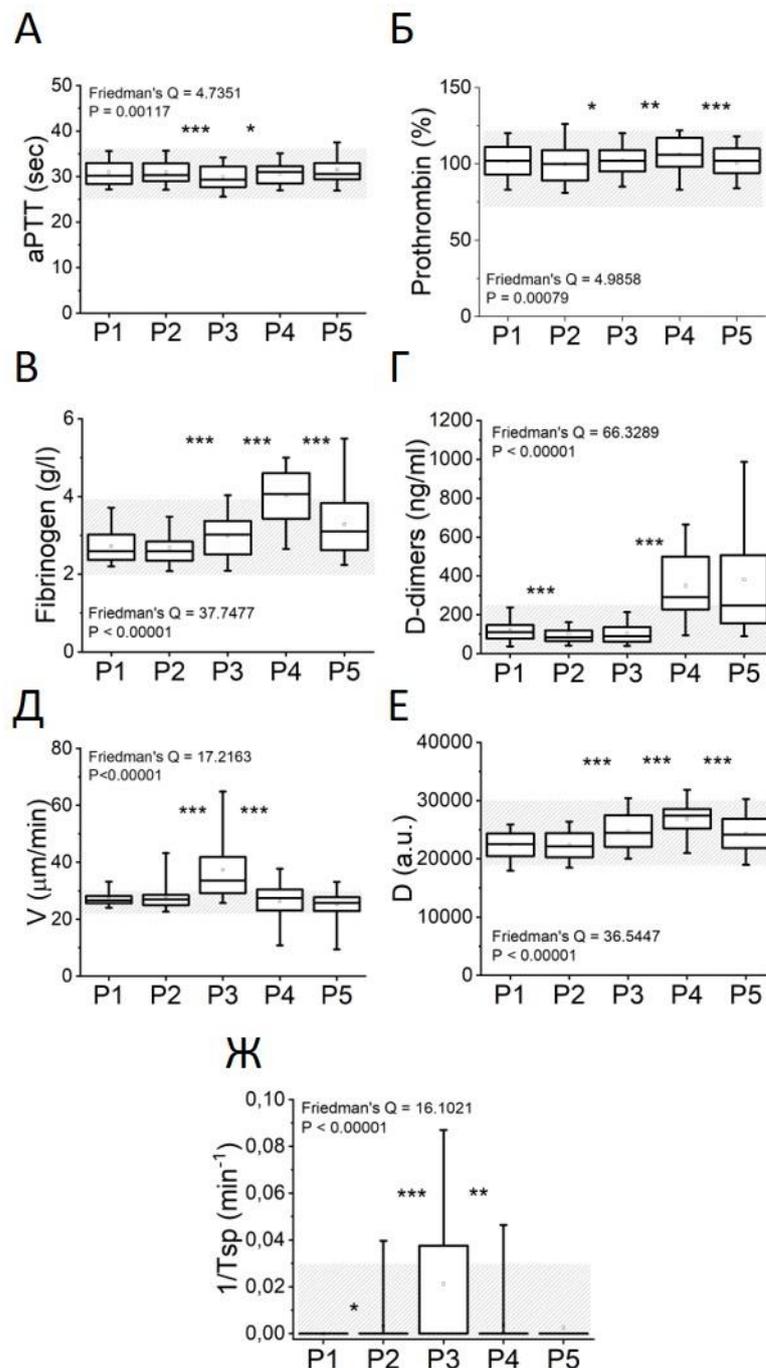


Рисунок 28. Динамика параметров свертывания у пациентов при проведении ЭКО. (А) АЧТВ (N = 47), (В) протромбин (N = 45), (С) фибриноген (N = 45), (D) D-димеры (N = 44), (E) V в тромбодинамике (N) = 53), (F) D в тромбодинамике (N = 50) и (G) 1 / Tsp в тромбодинамике (N = 54): до ЭКО (T1), через неделю после начала стимуляции суперовуляции (T2), в день пункции ооцитов (T3), в день переноса эмбриона (T4) и через неделю после переноса эмбриона (P5). Заштрихованная область соответствует нормальному диапазону. \*, \*\* и \*\*\* указывают на достоверные различия (P <0,05, P <0,01 и P <0,001 соответственно; парный критерий Уилкоксона) между последовательными временными точками.

Обнаружено, что гиперкоагуляция с повышенной скоростью роста сгустка в анализе тромбодинамики перед началом цикла ЭКО ассоциирована с повышенным риском негативного исхода программы ЭКО. Таким образом, данное исследование потенциально полезно для применения тромбодинамики для мониторинга гемостаза у женщин с диагнозом бесплодие перед процедурой ЭКО с целью выбора группы, требующей коррекции гемостаза для увеличения шансов достижения беременности вследствие процедуры. Также, в данном исследовании было показано, что высокодозная гормональная терапия при стимуляции суперовуляции действительно приводит к состоянию гиперкоагуляции у большинства пациенток, однако эта гиперкоагуляция не является клинически значимой и не влияет на исход программы ЭКО.

### **1.1.13. Прокоагулянтная активность микровезикул, полученных из разных клеток**

Влияние микровезикул (МВ), полученных *in vitro* из основных возможных источников МВ в плазме крови на активацию свертывания исследовали по появлению центров свертывания вдали от активатора в тесте Тромбодинамика. Моноцитарные МВ, несущие тканевый фактор, вызывают свертывание за счет образования сотен крайне медленно растущих сгустков. Эритроцитарные МВ, активирующие плазму по контактному пути, - за счет образования единичных быстро растущих сгустков, со скоростью близкой к скорости роста сгустка от поверхности с высокой плотностью тканевого фактора (Рисунок 29). Концентрации эритроцитарных МВ, необходимые для появления сгустков в 100 раз выше, чем моноцитарных. Тромбоцитарные МВ качественно похожи на эритроцитарные, но вызванные ими сгустки растут в 2 раза медленнее. Эндотелиальные МВ по характеру образования спонтанных сгустков похожи на

моноцитарные, но на высоких концентрациях МВ достигаются существенно большие скорости роста сгустков.

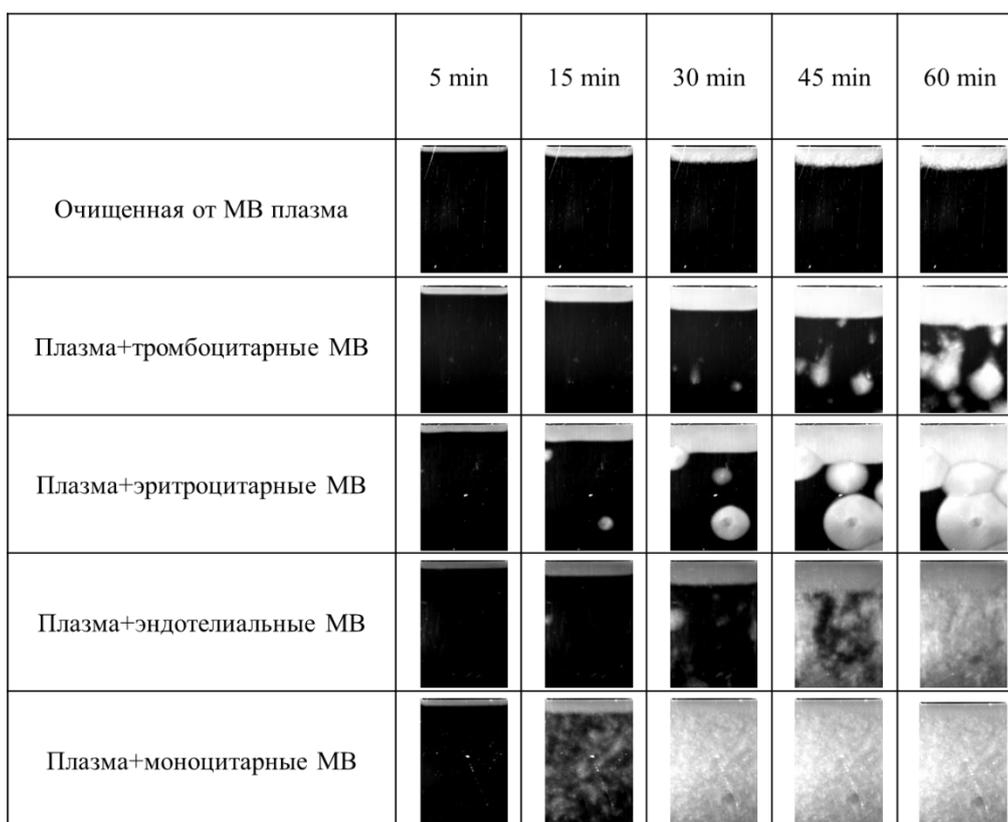


Рисунок 29. Фотографии роста сгустка от поверхности с иммобилизованным тканевым фактором (сверху) и типичных картин образования сгустков в объеме плазмы, вызванных добавлением в очищенную от микровезикул плазму микровезикул происходящих от разных клеток. Так как концентрации МВ разного происхождения, приводящие к образованию центров свертывания в объеме плазмы различаются до 100 раз, фотографии представлены для произвольных концентраций, для которых картина образования центров хорошо просматривается за 60 мин. Концентрация тромбоцитарных МВ на фотографиях -  $627 \cdot 10^3$ /мкл, эритроцитарных -  $500 \cdot 10^3$ /мкл, эндотелиальных -  $480 \cdot 10^3$ /мкл, моноцитарных -  $132 \cdot 10^3$ /мкл.

Об участии МВ в распространении свертывания можно судить по их влиянию на скорость роста сгустка от поверхности с иммобилизованным тканевым фактором. Ранее мы показали, что зависимости скорости от тромбоцитарных МВ и МВ, полученных из культур эндотелиальных и моноцитарных клеток, достоверно не отличались друг от друга. Однако эритроцитарные МВ способны увеличивать стационарную скорость роста сгустка более чем в 2,4 раза, что достоверно больше, чем МВ другого происхождения или искусственные везикулы. В 2019 г мы получили, что эта активность не определяется фосфатидилсерином, т.к. увеличение концентрации искусственных везикул приводит к

насыщению скорости на достоверно более низком уровне, чем достигается при добавлении эритроцитарных МВ, а увеличение содержания фосфатидилсерина в везикулах приводит к уменьшению концентрации, при которой достигается насыщение, но не меняет уровень насыщения (Рисунок 30). Активность эритроцитарных МВ зависит от способа их получения и может меняться при некоторых патологиях эритроцитов.

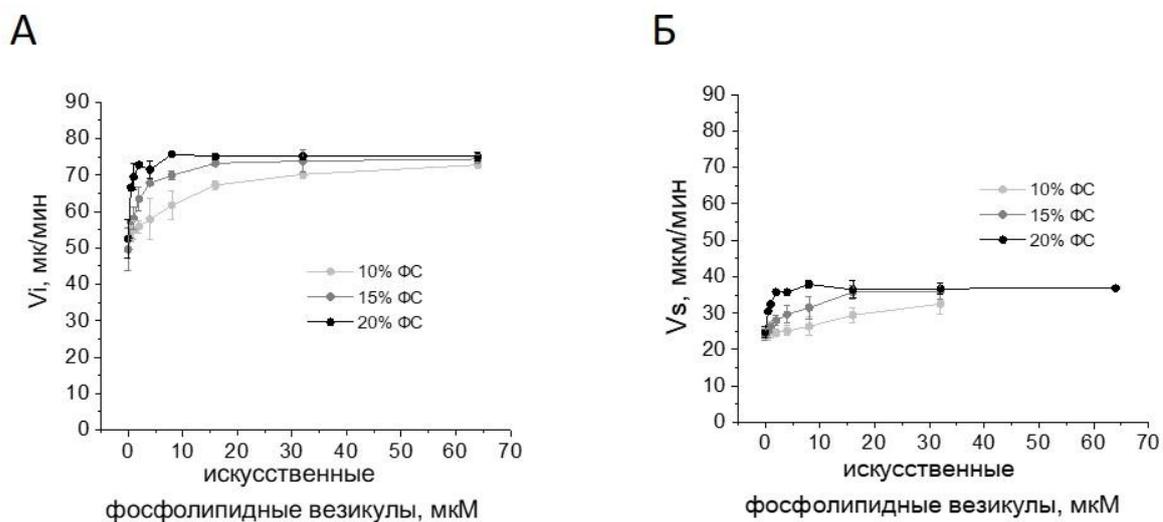


Рисунок 30. Влияние искусственных везикул на распространение свёртывания.

Зависимость средней  $\pm$  стандартная ошибка начальной скорости (А) и стационарной скорости (Б) от концентрации искусственных фосфолипидных везикул, содержащих 10 % (n=3), 15 % (n=3) и 20% (n=2) фосфатидилсерина (ФС).

Способность МВ активировать свёртывание можно наблюдать в Тромбодинамике по образованию центров свёртывания вдали от активатора называемых спонтанными сгустками, так как их образование обусловлено материалом в плазме, а не активацией, вносимой в опыте. Ранее было показано, что МВ играют ключевую роль в образовании спонтанных сгустков плазме пациентов с различными патологиями.

Для каждого типа МВ в очищенной от МВ плазме были проведены титровки от 0 до концентраций, приводящих к появлению спонтанных сгустков за 60 мин. Характерные для каждого типа МВ фотографии образования спонтанных сгустков имеют качественные различия, по количеству, скорости появления и роста спонтанных сгустков (Рисунок 31).

	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
Очищенная от МВ плазма					
Плазма+тромбоцитарные МВ					
Плазма+эритроцитарные МВ					
Плазма+эндотелиальные МВ					
Плазма+моноцитарные МВ					

Рисунок 31. Фотографии роста сгустка от поверхности с иммобилизованным тканевым фактором (сверху) и типичных картин образования сгустков в объеме плазмы, вызванных добавлением в очищенную от микровезикул плазму микровезикул происходящих от разных клеток. Так как концентрации МВ разного происхождения, приводящие к образованию центров свертывания в объеме плазмы различаются до 100 раз, фотографии представлены для произвольных концентраций, для которых картина образования центров хорошо просматривается за 60 мин. Концентрация тромбоцитарных МВ на фотографиях -  $627 \cdot 10^3$ /мкл, эритроцитарных -  $500 \cdot 10^3$ /мкл, эндотелиальных -  $480 \cdot 10^3$ /мкл, моноцитарных -  $132 \cdot 10^3$ /мкл.

Зависимости количества центров от времени для МВ разного происхождения представлены на Рисунке 32 А-Д. Чтобы видимое уменьшение скорости появления спонтанных сгустков в результате заполнения объема появившимися ранее сгустками не искажало зависимости, прирост числа центров отнормирован на долю свободной площади кадра. По имеющимся данным для тромбоцитарных и эритроцитарных МВ вид зависимости числа центров от времени определить сложно. Для моноцитарных и эндотелиальных МВ эта зависимость носит экспоненциальный характер.

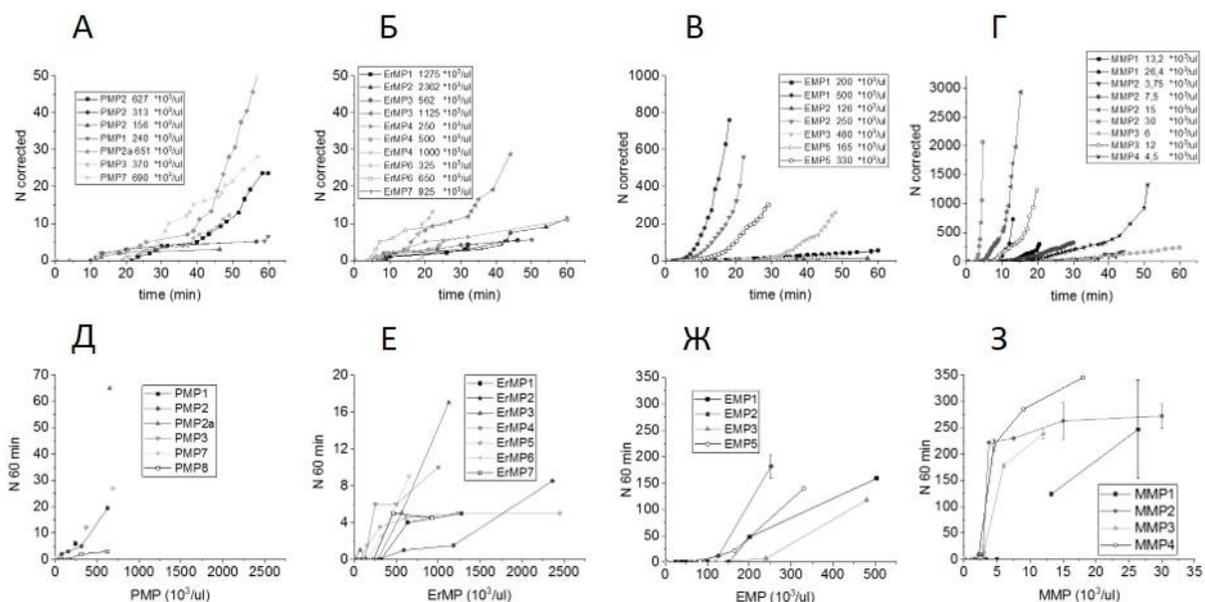


Рисунок 32. Зависимости от времени количества центров свертывания (каким оно было бы, если бы площадь, на которой они могут появляться не уменьшалась в результате роста появившихся ранее центров). Разные кривые соответствуют разным образцам МВ и разным концентрациям как указано в легендах. Д-З зависимости от концентрации числа образованных за 60 мин центров спонтанного свертывания для разных образцов МВ. Опыты поставлены в очищенной от МВ плазме с добавлением А, Д тромбоцитарных МВ, Б, Е – эндотелиальных МВ, В, Ж – эритроцитарных МВ, Г, З – моноцитарных МВ.

Естественно предположить, что время появления спонтанного сгустка определяется локальной концентрацией активатора в его центре. В этом случае, если к появлению сгустка приводит отдельная МВ, время появления первых сгустков в широких пределах не должно зависеть от концентрации МВ. Для эритроцитарных МВ это предположение подтверждается (Рисунок 33 Б), для тромбоцитарных и эндотелиальных МВ есть тенденция к уменьшению времени появления первых 5 сгустков с увеличением концентрации, но для определенного ответа данных не достаточно (Рисунок 33 А,В), для моноцитарных МВ время появления первых 5 сгустков убывает обратно пропорционально концентрации, что указывает на увеличение вероятности образования сгустка при уменьшении расстояния между МВ (Рисунок 33 Г). В пользу предположения о взаимодействии между МВ говорит также факт, что для всех типов МВ в опытах, где за час образовывалось более 10 центров, нарастание числа центров со временем шло с ускорением. Т.к. количество образованных за час центров при добавлении в плазму МВ различного происхождения и в разных концентрациях различается более, чем в 100 раз.

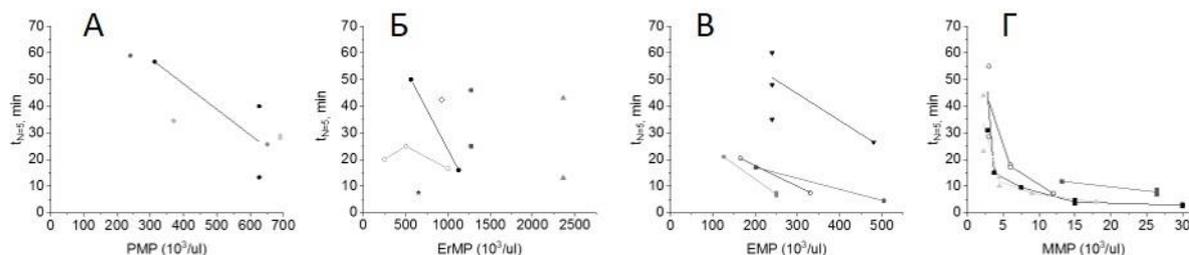


Рисунок 33. Зависимость времени появления первых 5 спонтанных сгустков ( $tN=5$ ) от концентрации (А) тромбоцитарных, (Б) эритроцитарных, (В) эндотелиальных и (Г) моноцитарных МВ. Точка соответствует индивидуальному эксперименту, средние значения  $tN=5$  при разных концентрациях для одного образца МВ соединены линиями, символы разных типов соответствуют разным образцам МВ.

Для эритроцитарных МВ в минимальных концентрациях, вызывающих спонтанное свертывание характерно образование единичных центров, растущих со скоростью, близкой к скорости роста сгустка в тех же опытах (48 мкм/мин в среднем). С увеличением концентрации количество образованных за час сгустков возрастало, но ввиду их быстрого роста они быстро заполняли весь свободный объем кюветы и в наших опытах максимальное число образованных за час центров не превышало 17 (Рисунок 32 Е). Сгустки от тромбоцитарных МВ растут в среднем со скоростью  $14 \pm 8$  мкм/мин. В результате до полного свертывания при высоких концентрациях может образовываться большее число сгустков (Рисунок 32 Д). Моноцитарные МВ по мере увеличения концентрации сначала не вызывают спонтанное свертывание, затем появляется около десятка центров, рост которых в пространстве практически останавливается за первые 10-15 мин и весь объем плазмы не сворачивается, при дальнейшем незначительном увеличении концентрации происходит резкое переключение к образованию нескольких сотен центров (Рисунок 32 З), растущих с относительно низкой, но достоверно отличной от нуля скоростью, в среднем  $9 \pm 4$  мкм/мин. Плазма при этом сворачивается полностью, причём не только за счёт распространения сгустков в пространстве от отдельных центров, но и за счет свертывания во всём объеме. Эндотелиальные МВ по характеру образования спонтанных сгустков качественно похожи на моноцитарные, но зависимость числа центров от концентрации (Рисунок 32 Ж) существенно более плавная и на высоких концентрациях МВ достигаются существенно большие скорости роста сгустков, приближающиеся к скорости роста сгустка от активатора в тех же опытах.

Как описано выше, распределение фибриновых сгустков в пространстве в данном методе отражает профиль интенсивности светорассеяния. Анализ зависимости профилей интенсивности светорассеяния от времени позволяет ввести количественные

характеристики роста спонтанных сгустков. Соответствующие зависимости при добавлении в плазму МВ разного происхождения представлены на Рисунке 34. В плазме с тромбоцитарными и эритроцитарными МВ свертывание инициируется только в отдельных центрах, интенсивность светорассеяния возрастает по мере полимеризации фибрина в формирующемся центре и в соответствии с распространением сгустка по пространству уширяется область с высокой интенсивностью светорассеяния (Рисунок 34 А, Г). Нарастание интенсивности светорассеяния в центре сгустка будет далее характеризоваться максимальной скоростью  $V_{I\max}$ , распространение фронта спонтанного сгустка от центра – скоростью  $V_{sc}$ , рассчитанных как описано в материалах и методах. Если за время эксперимента в центре сгустка весь фибриноген переходит в фибрин, интенсивность светорассеяния в центре выходит на плато. В этой точке свертывание заканчивается и остаётся только распространение свёртывания в пространстве. Максимальная интенсивность в центре сгустка достигнутая к 60 мин далее обозначена  $I_{\max}$ . Для моноцитарных и эндотелиальных МВ зависимости профилей интенсивности светорассеяния от времени приведены для двух концентраций, условно «низкой» и «высокой», так как с увеличением концентрации наблюдаются качественные изменения в параметрах роста спонтанных сгустков. В плазме, содержащей моноцитарные и эндотелиальные МВ в «высоких» концентрациях, в некоторый момент времени начинается свертывание по всему объёму плазмы, что выражается в возрастании фона интенсивности светорассеяния (Рисунок 34 В, Е). При условно «низких» концентрациях моноцитарных МВ образуются отдельные центры, рост от которых быстро останавливается (Рисунок 34 Д). Эндотелиальные МВ оказываются особенно гетерогенными: в одном и том же образце при «низкой» концентрации от части центров свертывание распространяется, от других практически останавливается (Рисунок 34 Б).

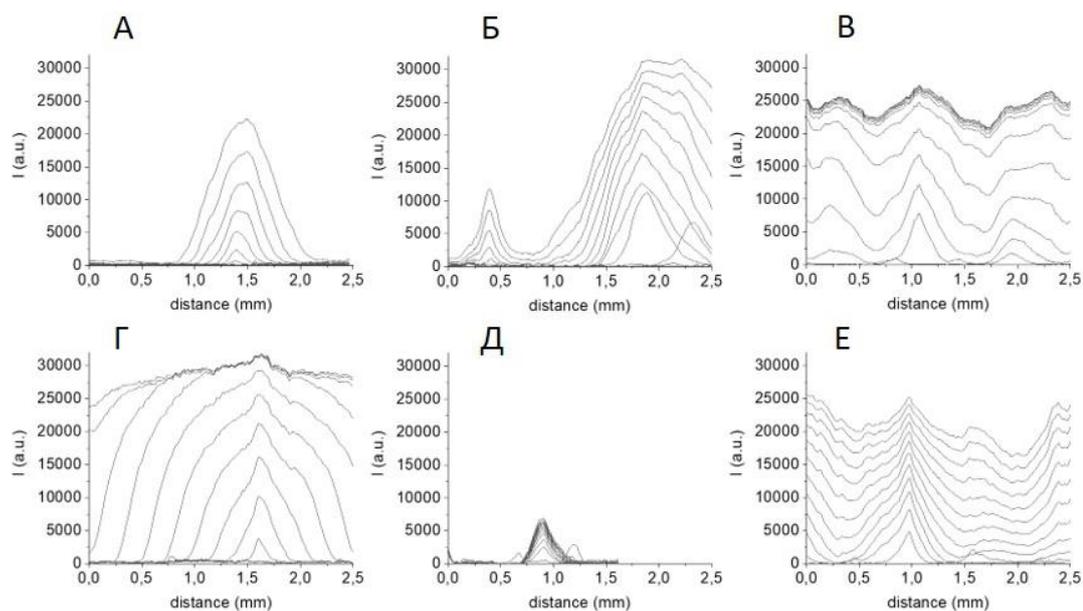


Рисунок 34. Зависимости от времени профилей интенсивности светорассеяния спонтанных сгустков при добавлении в плазму тромбоцитарных (А), эндотелиальных МВ в условно низких (Б) и условно высоких концентрациях (В), эритроцитарных (Г) и моноцитарных МВ в условно низких (Д) и условно высоких концентрациях (Е). Профили показаны с интервалом в 5 мин.

Скорость нарастания интенсивности светорассеяния в центре сгустка в некотором приближении пропорциональна скорости образования фибрина, а, следовательно, концентрации тромбина (на участке времени до полной полимеризации). По VI max можно косвенно судить о силе активации. Интенсивность светорассеяния в центре спонтанных сгустков, вызванных любым типом МВ, возрастает значительно медленнее, чем на активаторе (Рисунок 35), при этом максимальная интенсивность светорассеяния в центре спонтанного сгустка может превосходить максимальную интенсивность светорассеяния на активаторе в 1,4-1,7 раз (Рисунок 35).

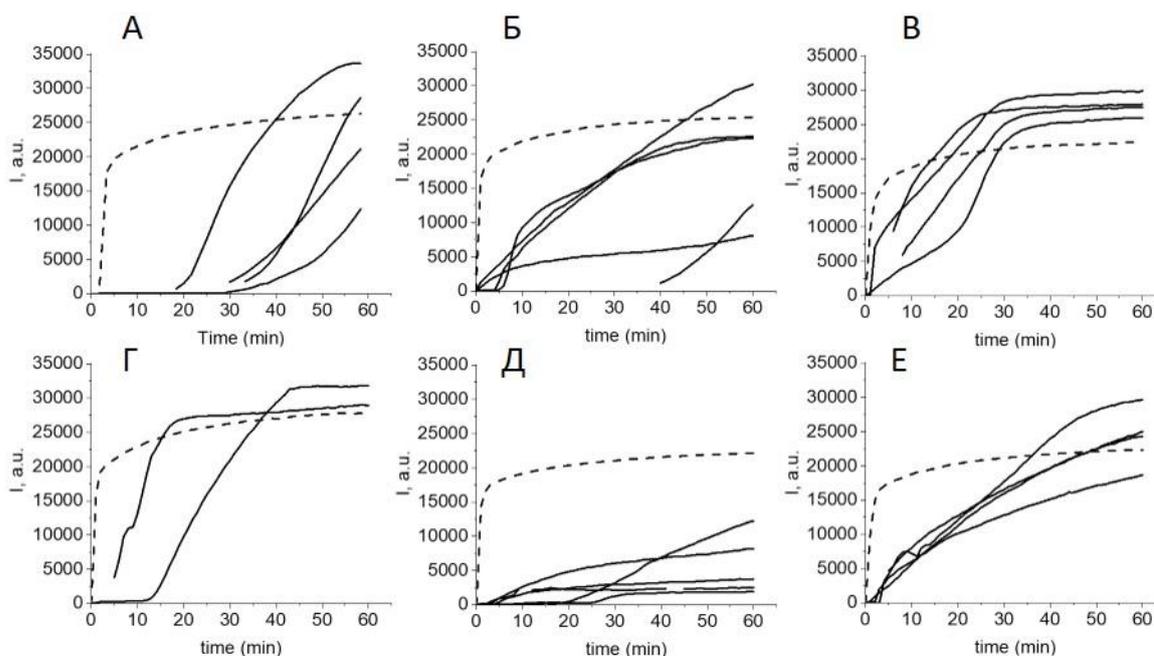


Рисунок 35. Зависимости от времени интенсивности светорассеяния в центре спонтанных сгустков (сплошные линии) и сгустка от активатора (пунктирная линия) при добавлении в плазму тромбоцитарных (А), эндотелиальных МВ в условно низких (Б) и условно высоких концентрациях (В), эритроцитарных (Г) и моноцитарных МВ в условно низких (Д) и условно высоких концентрациях (Е).

Увеличение максимальной интенсивности светорассеяния сгустка в результате увеличения диаметра фибриновых фибрилл при снижении концентрации тромбина было теоретически предсказано и экспериментально показано в статье (Weisel, Nagaswami, *Biophys J*, 1992). Разброс  $VI_{max}$  в пределах одного опыта в среднем составлял от 33% для тромбоцитарных МВ, до 60% для моноцитарных. Изменения  $VI_{max}$  с увеличением концентрации уступали разбросам внутри опыта для всех МВ кроме эндотелиальных, что дает основания в грубом приближении сравнивать средние  $VI_{max}$  по всем сгусткам, образованным при разных концентрациях. Такое сравнение представлено на Рисунке 36 А.  $VI_{max}$  для эритроцитарных МВ в среднем достоверно выше всех остальных, для моноцитарных МВ – достоверно ниже. Тромбоцитарные и эндотелиальные МВ в этом отношении достоверно не различаются. Однако для всех типов МВ скорость нарастания интенсивности светорассеяния в центре сгустка в среднем не превышала 0,1 - 0,15 от скорости нарастания интенсивности светорассеяния на активаторе (Рисунок 36 Б), следовательно, концентрация тромбина в центре спонтанных сгустков в 7-10 раз уступает концентрации тромбина на активаторе.

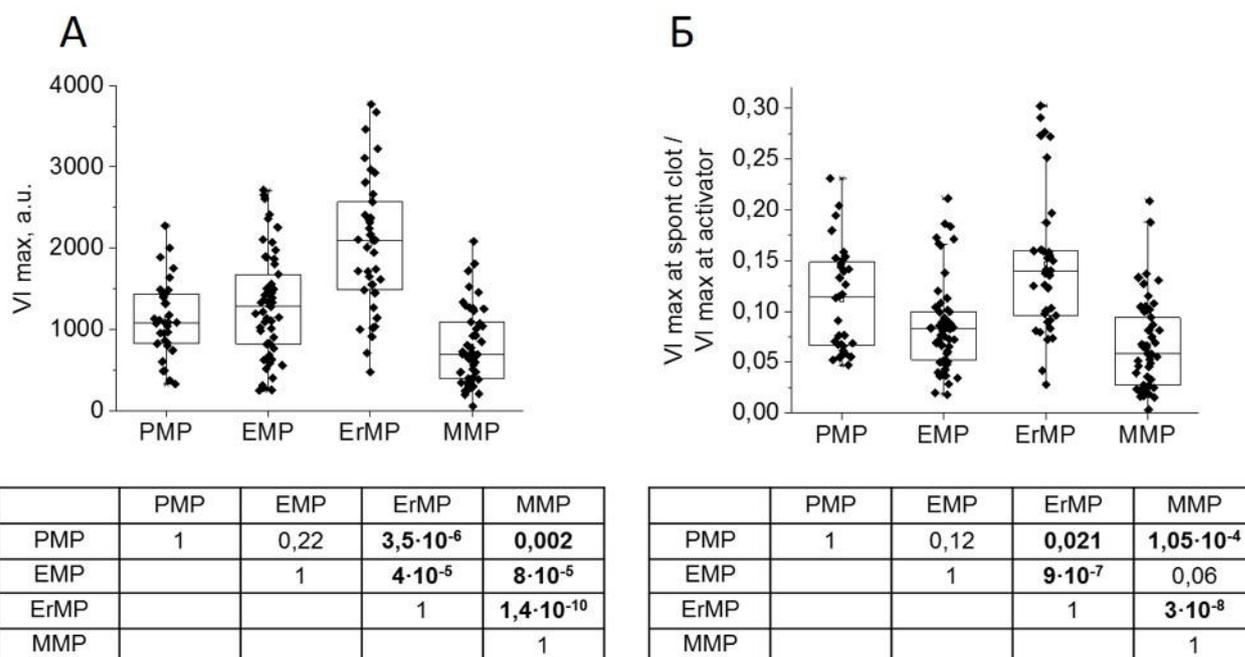


Рисунок 36. Максимальная скорость роста интенсивности светорассеяния в центре спонтанных сгустков, образованных при добавлении в плазму МВ разного происхождения, и её отношение к скорости роста интенсивности светорассеяния при активаторе. (А) Усредненные по образцам МВ, полученным при разных выделениях, и по разным концентрациям значения максимальной скорости роста интенсивности в центре спонтанных сгустков. (Б) Усредненное отношение максимальной скорости роста интенсивности в центре спонтанных сгустков к скорости роста интенсивности светорассеяния при активаторе в тех же опытах. В таблицах под гистограммами приведены уровни значимости различия соответствующих параметров роста сгустков от МВ разного происхождения по критерию Манна - Уитни.

Если нарастание интенсивности в центре сгустка зависит от тромбина, образованного в непосредственной близости от активатора, то распространение сгустка в пространстве зависит от тромбина, образованного на расстоянии от активатора в результате работы положительных обратных связей. Таким образом параметры  $VI_{max}$  и  $V_{sc}$  в значительной степени определяются разными реакциями. Первый характеризует фазу активации, второй – фазу распространения свёртывания. Размер спонтанных сгустков в большинстве случаев зависит от времени линейно (Рисунок 37). В ряде случаев линейному участку предшествует плавный разгон от нулевой скорости. При возрастании фона интенсивности светорассеяния наблюдается ускорение роста (Рисунок 37 В), хотя соответствующий участок уже не корректно рассматривать как рост отдельного сгустка. С увеличением концентраций скорости роста спонтанных сгустков в среднем возрастают, но

эти изменения, как и для скорости роста интенсивности, меньше разбросов между скоростями внутри одного опыта, поэтому мы рассматривали усреднённые для разных концентраций данные (Рисунок 38 А). Достоверной разницы в скоростях роста спонтанных сгустков между тромбоцитарными и эндотелиальными МВ в среднем не наблюдалось. Скорость роста спонтанных сгустков от моноцитарных МВ достоверно ниже всех остальных, от эритроцитарных МВ – достоверно выше.

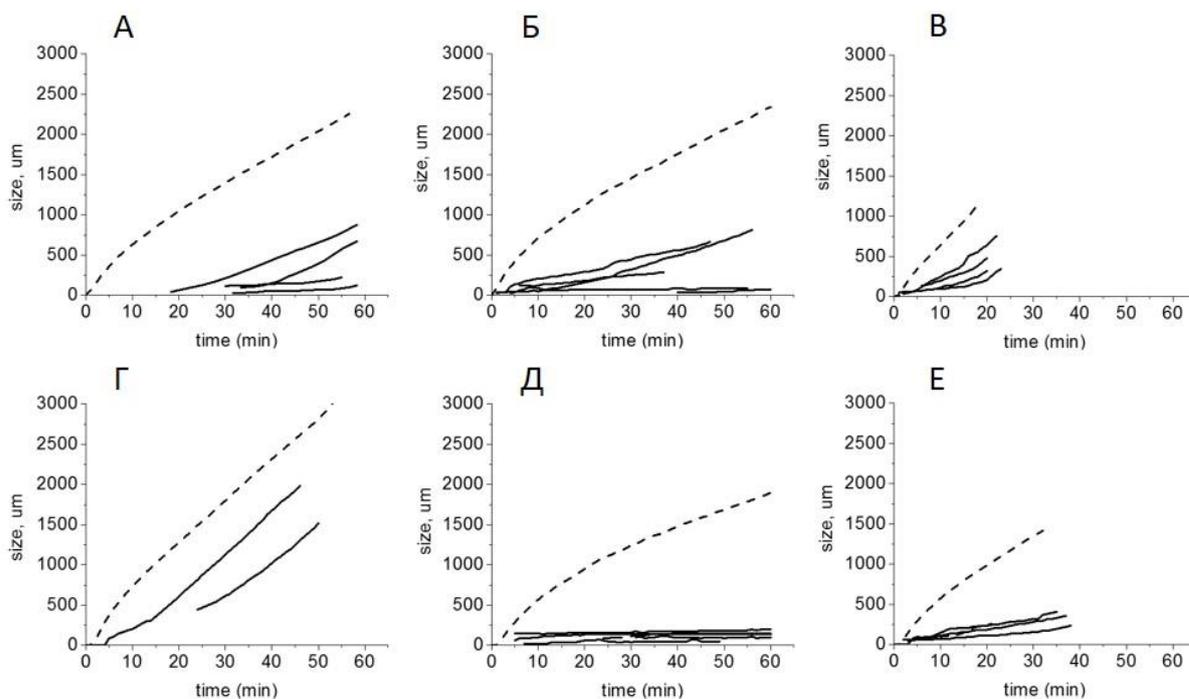


Рисунок 37. Зависимости от времени размера сгустка от активатора (пунктирная линия) и спонтанных сгустков (сплошные линии) при добавлении в плазму тромбоцитарных (А), эндотелиальных МВ в условно низких (Б) и условно высоких концентрациях (В), эритроцитарных (Г) и моноцитарных МВ в условно низких (Ж) и условно высоких концентрациях (Е).

Ранее было показано, что при наличии в плазме достаточного количества фосфолипидной поверхности и надпороговой активации стационарная скорость роста сгустка в широком диапазоне не зависит от концентрации ТФ, типа несущих ТФ клеток и пути активации. Можно было ожидать, что скорость роста спонтанных сгустков и сгустка от активатора будут близки. Однако разброс скоростей спонтанных сгустков внутри одного опыта в среднем составляет 4мкм/мин (33%) для тромбоцитарных МВ, 8 мкм/мин (22%) для эритроцитарных МВ, 7 мкм/мин (76%) для эндотелиальных МВ, 2,5 мкм/мин (84%) для моноцитарных МВ. Только при добавлении эритроцитарных МВ скорость роста спонтанных сгустков приблизительно соответствует скорости роста сгустка от активатора (0,93), для ТМВ, ЭМВ и ММВ медиана отношения скоростей равна 0,5, 0,22 и 0,09

соответственно (Рисунок 38 Б). Коэффициент корреляции Спирмана между скоростью роста сгустка от активатора и скоростями роста спонтанных сгустков для эритроцитарных МВ – 0,74 ( $p=3 \cdot 10^{-15}$ ), 0,78 ( $p=5 \cdot 10^{-23}$ ) для эндотелиальных МВ, 0,61 ( $p=3 \cdot 10^{-10}$ ) для моноцитарных МВ и 0,36 ( $p=0,024$ ) для тромбоцитарных МВ.

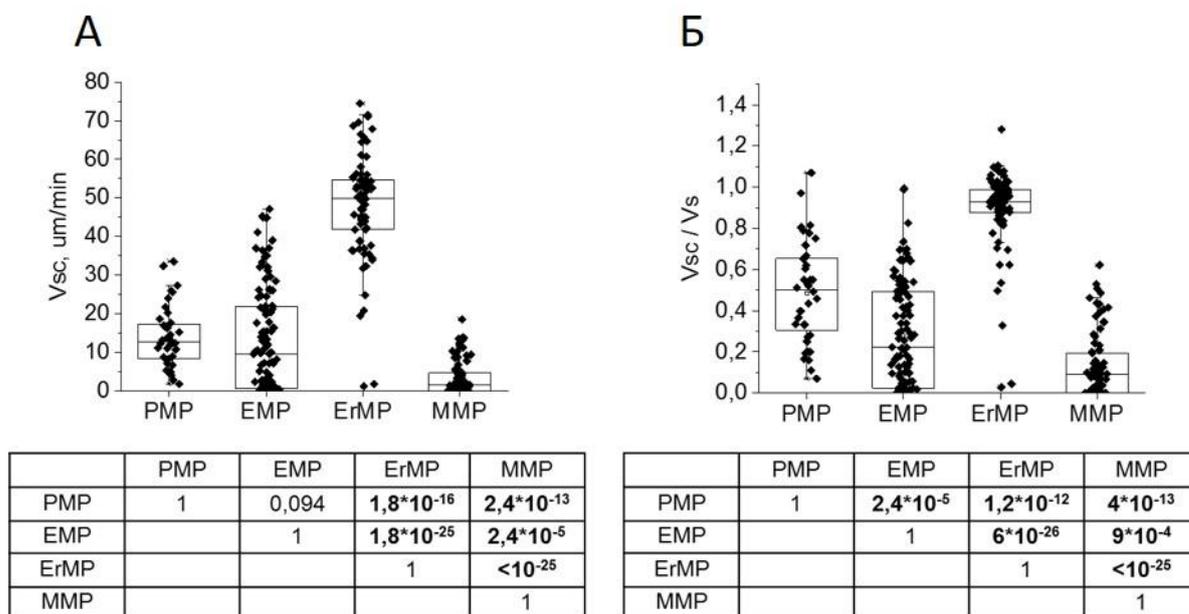


Рисунок 38. Скорость распространения фронта свертывания от центра спонтанных сгустков, образованных при добавлении в плазму МВ разного происхождения, и её отношение к скорости распространения фронта свертывания от активатора. (А) Усредненные по образцам МВ, полученным при разных выделениях, и по разным концентрациям значения скорости распространения фронта от центра спонтанных сгустков. (Б) Усредненное отношение скорости распространения фронта от центра спонтанных сгустков к скорости распространения фронта от активатора в тех же опытах. В таблицах под гистограммами приведены уровни значимости различия соответствующих параметров роста сгустков от МВ разного происхождения по критерию Манна - Уитни.

Можно предположить, что в системе недостаточно липидов для поддержания распространения свертывания во всех случаях, кроме эритроцитарных МВ, для которых в результате слабой активации спонтанные сгустки образуются при наиболее высокой концентрации МВ, а, следовательно, общей концентрации липидов. В таком случае можно ожидать зависимости скорости от силы активации конкретного центра. У нас нет возможности напрямую померить активацию от каждого центра, но косвенные данные о ней даёт скорость нарастания интенсивности светорассеяния и лаг-тайм появления спонтанных сгустков. Для эритроцитарных МВ корреляция максимальной скорости

нарастания интенсивности светорассеяния и скорости роста сгустка в пространстве отсутствовала  $r=0,19$ ,  $p=0,22$ . Для других типов МВ корреляция этих скоростей была хоть и достоверной, но слабой:  $0,43$  ( $p=0,026$ ) для тромбоцитарных МВ,  $0,58$  ( $p=8 \cdot 10^{-9}$ ) для эндотелиальных МВ,  $0,32$  ( $p=0,004$ ) – для моноцитарных МВ (Рисунок 39 А-Г). Лаг-тайм также не обнаруживал сильной корреляции со скоростью роста спонтанных сгустков:  $-0,45$  ( $p=0,03$ ) - для тромбоцитарных МВ,  $-0,64$  ( $p=1,2 \cdot 10^{-4}$ ) - для эритроцитарных,  $-0,35$  ( $p=0,025$ ) - для эндотелиальных,  $-0,5$  ( $p=0,0015$ )- для моноцитарных (Рисунок 39 Д-З). Т.о. разброс между скоростями роста сгустков в одном опыте определяется по крайней мере не только силой активации.

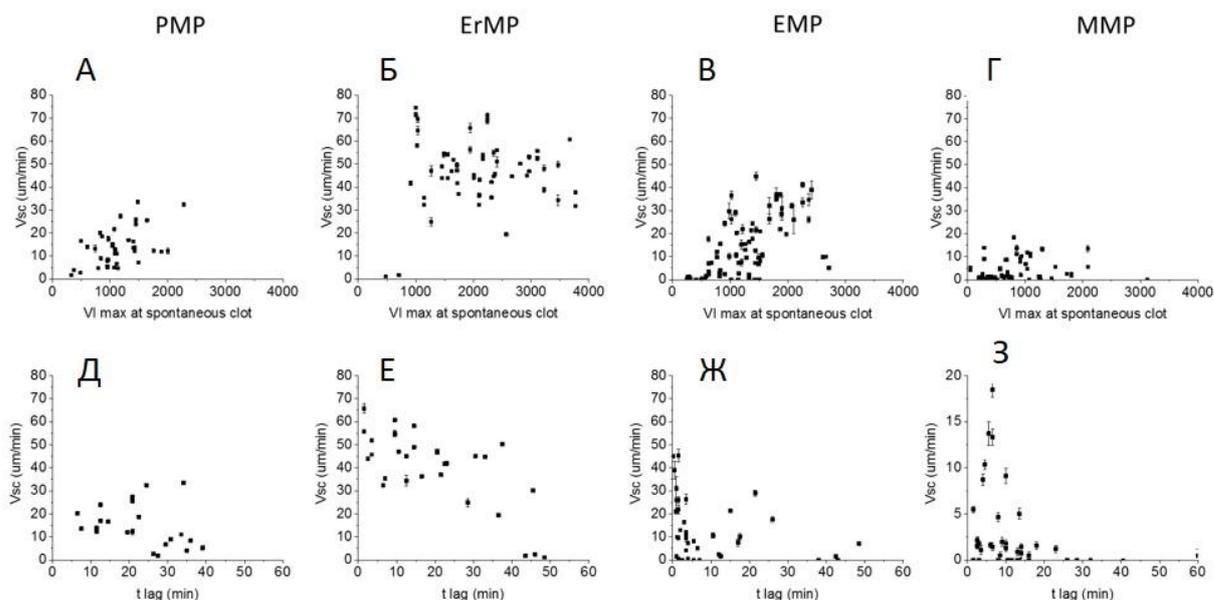


Рисунок 39. Корреляции скорости распространения фронта свертывания от центра спонтанных сгустков с максимальной скоростью роста интенсивности светорассеяния в центре спонтанных сгустков (А-Г) и с временем появления спонтанных сгустков (Д-З), образованных при добавлении в плазму тромбоцитарных (А, Д), эритроцитарных (Б, Е), эндотелиальных (В, Ж) и моноцитарных МВ (Г, З).

Активность МВ разного происхождения в отношении активации свертывания можно оценивать по отношению количества образованных за час центров свертывания к полному количеству МВ в кювете. Это отношение для тромбоцитарных и эритроцитарных МВ в кювете меньше, чем  $1/10^6 - 1/10^7$ , из чего можно предположить, что центрами свертывания могут быть не сами МВ, а более крупные остаточные фрагменты клеток. Для ТФ содержащих МВ это отношение составляет  $10^{-3} - 10^{-5}$  и при достижении некоторых концентраций этих МВ свертывание начинается по всему объему, а не только от видимых

отдельных центров, что указывает на вероятное участие в активации свёртывания значительно большей доли МВ.

Об участии МВ в распространении свертывания можно судить по их влиянию на скорость роста сгустка от поверхности с иммобилизованным тканевым фактором. Зависимости скорости от тромбоцитарных МВ и МВ, полученных из культур эндотелиальных и моноцитарных клеток, достоверно не отличались друг от друга и по максимальному эффекту от искусственных липидных везикул, состоящих на 80% из фосфатидилхолина и на 20% из фосфатидилсерина. Т.к. белковый состав для всех клеток разный, вероятно, этот результат свидетельствует о том, что скорость роста сгустка определяется, в первую очередь, липидами мембраны. Однако эритроцитарные МВ способны увеличивать стационарную скорость роста сгустка более чем в 2,4 раза, что в ~3 раза превосходит активность микровезикул, происходящих от других клеток крови, в ~2,5 раз активность искусственных фосфолипидных везикул. Эта активность не определяется фосфатидилсерином, т.к. увеличение концентрации искусственных везикул приводит к насыщению скорости на более низком уровне, чем достигается при добавлении эритроцитарных МВ, а увеличение содержания фосфатидилсерина в везикулах приводит к уменьшению концентрации, при которой достигается насыщение, но не меняет уровень насыщения. Активность эритроцитарных МВ зависит от способа их получения и может меняться при некоторых патологиях эритроцитов.

#### **1.1.14. Спектроскопические исследования взаимодействия белков плазмы крови с флуоресцентными маркерами с целью моделирования связывания белков с различными лигандами, в том числе и с некоторыми лекарственными препаратами**

Бычий сывороточный альбумин (БСА) – это белок из семейства альбуминов, выполняющий транспортные функции в плазме крови. Благодаря уникальному строению (существованию различных центров связывания) БСА образует разнообразные комплексы с органическими и неорганическими лигандами. Это определяет основную функцию белка в кровотоке – транспорт физиологических метаболитов и некоторых лекарственных препаратов, помимо поддержания онкотического давления крови и участия в антиокислительных процессах.

Для исследования процессов комплексообразования БСА с лигандами широко применяется метод флуоресцентного анализа. Флуоресцентными методами с применением наномаркеров можно регистрировать очень тонкие конформационные перестройки БСА, что позволяет судить о качественном состоянии самого белка, а по

нему и о степени патологического состояния организма в различных медицинских исследованиях.

В работе использованы наномаркеры семейства флуоресцеина – исходное соединение флуоресцеин и его галоген – производные (тетра-хлор-тетра-йод-производная – бенгальский розовый, тетра-бром-производная – эозин, тетра-йод-производная – эритрозин). Получены экспериментальные данные по константам комплексообразования (ассоциации) наномаркеров с БСА и интерпретированы с помощью различных моделей.

Для различных значений рН получены зависимости  $(F_0/F) - 1$  от  $[Q_0]$ , где  $F_0$  – интенсивность флуоресценции флуоресцеина / эритрозина / эозина / бенгальского розового в отсутствие БСА,  $F$  – интенсивность флуоресценции соответствующих наномаркеров в присутствии БСА,  $[Q_0]$  – концентрация БСА. Во всех случаях полученные зависимости  $(F_0/F) - 1$  от  $[Q_0]$  имеют нелинейный характер. Для их интерпретации изучены различные модели.

*Модель 1. Разложение кривых тушения флуоресценции на два линейных случая в рамках модели Штерна – Фольмера.*

При тушении флуоресценции наномаркеров в растворах добавлением различных концентраций БСА можно воспользоваться теорией Штерна – Фольмера и рассчитать  $K$  – константу тушения флуоресценции наномаркера, определяющую комплексообразование каждого наномаркера с белком (M-1).

Для более точного описания полученных нелинейных зависимостей  $(F_0/F) - 1$  от  $[Q_0]$  разложим их в рамках данной Модели 1 на две составляющие – для БСА  $< 20$  мкМ и для БСА  $> 20$  мкМ, линейно их аппроксимируем и получим две константы (Рисунок 40 – константа  $K_1$  для БСА  $< 20$  мкМ и Рисунок 41 – константа  $K_2$  для БСА  $> 20$  мкМ) тушения флуоресценции наномаркеров. Эти константы отражают различные виды взаимодействий наномаркеров с БСА. Видно из сравнения констант  $K_1$  и  $K_2$ , что для относительно малой концентрации белка комплексообразование более сильное по сравнению с относительно большой концентрации.

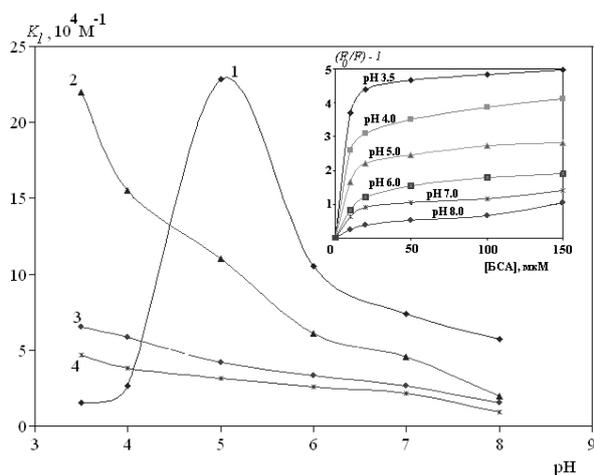


Рисунок 40. Зависимости констант (в рамках Модели 1) тушения флуоресценции К1 наномаркеров в растворах БСА от рН: 1 – флуоресцеин, 2 – эритрозин, 3 – эозин, 4 – бенгальский розовый. На вставке: Графики Штерна – Фольмера тушения флуоресценции эритрозина добавлением различных концентраций БСА при различных значениях рН.

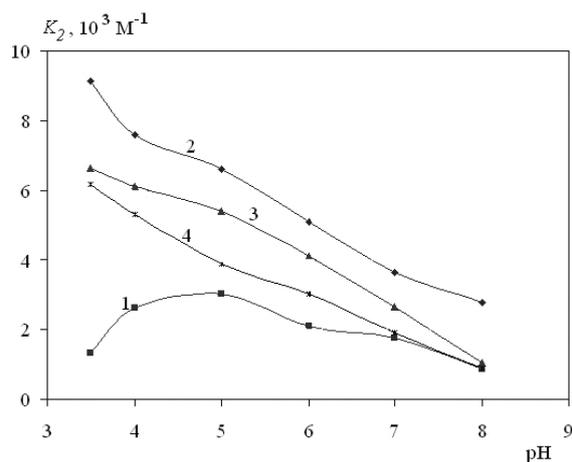


Рисунок 41. Зависимости констант (в рамках Модели 1) тушения флуоресценции К2 наномаркеров в растворах БСА от рН: 1 – флуоресцеин, 2 – эритрозин, 3 – эозин, 4 – бенгальский розовый.

Из Рисунков 40-41 видно, что обе константы тушения флуоресценции (К1 и К2) флуоресцеина, фактически отражающие комплексообразование наномаркера и белка, имеют нелинейный характер с максимумом при рН 5.0. Полученный результат можно объяснить, исходя из качественного рассмотрения сравнительных характеристик электрического заряда Q молекул белка и наномаркеров (Рисунок 42).

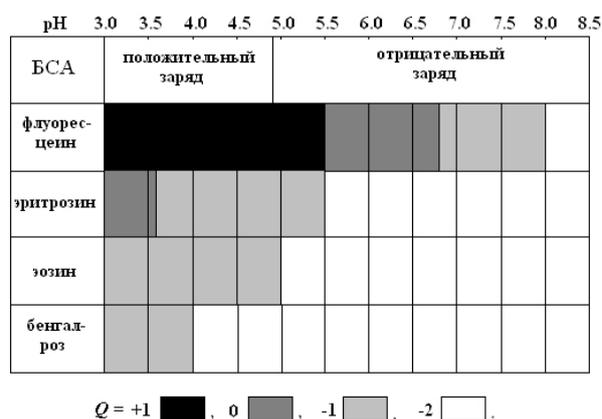


Рисунок 42. Качественные сравнительные характеристики электрического заряда  $Q$  молекул БСА и наномаркеров.

Для эритрозина видно (Рисунки 40-41), что максимально эффективное комплексообразование эритрозина с БСА имеет место при  $pH < 5.0$ , т.е. когда белок в целом положительно заряжен, а эритрозин или находится в нейтральной форме или находится в форме моноаниона (Рисунок 42). Для эозина видно (Рисунки 40-41), что максимально эффективное связывание эозина с БСА имеет место при  $pH < 5.0$ , когда молекулы белка в целом положительно заряжены, а эозин находится в форме моноаниона (Рисунок 42). Для бенгальского розового (Рисунки 40-41) видно, что максимально эффективное взаимодействие бенгальского розового с БСА имеет место при  $pH < 5.0$ , когда молекулы белка в целом положительно заряжены, а бенгальский розовый находится в формах моноаниона или дианиона (Рисунок 42).

Также из Рисунков 40-41 видно, что обе константы тушения флуоресценции ( $K1$  и  $K2$ ) галоген-производных флуоресцеина имеют монотонно убывающий характер с ростом  $pH$ .

Обнаружено, что наличие в молекуле наномаркера более электроотрицательного атома приводит к уменьшению значений констант  $K1$ , отражающих фактически комплексообразование наномаркера с БСА в области  $pH 5.0 - 8.0$ , что указывает на влияние электроотрицательности молекул наномаркеров на ионный механизм взаимодействия наномаркеров с белком.

*Модель 2. Описание зависимостей Штерна – Фольмера сигмоидальной функцией.*

При нелинейном характере зависимости  $(F_0/F) - 1$  от  $[Q_0]$  тушение флуоресценции наномаркеров в растворах добавлением различных концентраций белка можно аппроксимировать с помощью сигмоидальной функции и получить тогда  $n$  – коэффициент кооперативности Хилла и  $K_{\text{sigm}}$  – константу тушения флуоресценции наномаркеров, фактически константу комплексообразования наномаркеров с белком ( $M-1$ ) (Рисунок 43).

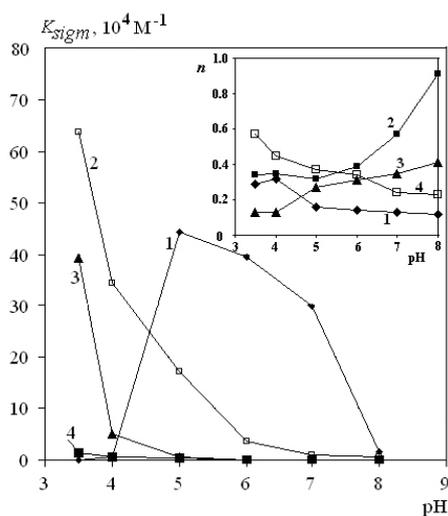


Рисунок 43. Зависимости констант (в рамках Модели 2) тушения флуоресценции ( $K_{sigm}$ ) наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах БСА от рН: 1 – флуоресцеин, 2 – эритрозин, 3 – эозин, 4 – бенгальский розовый. На вставке: Зависимости коэффициента  $n$  кооперативности Хилла взаимодействия наномаркеров семейства флуоресцеина с БСА от рН.

Видно, что зависимость константы  $K_{sigm}$  для флуоресцеина от рН имеет нелинейный характер с максимумом при рН 5.0. Видно, как и в предыдущей модели, константы тушения флуоресценции галоген-производных флуоресцеина имеют монотонно убывающий характер с ростом рН, что указывает на сильное комплексообразование данных наномаркеров с белком при низких значениях рН. При этом наличие в молекуле наномаркера более электроотрицательного атома приводит к уменьшению значений констант комплексообразования  $K_{sigm}$  наномаркера с БСА при соответствующих значениях рН.

При этом обнаружено отличие в растворах БСА от растворов САЧ для зависимостей  $K_{sigm}$  константы комплексообразования галоген-производных флуоресцеина от рН: средняя скорость убывания значений  $K_{sigm}$  от значения рН ( $\Delta K_{sigm}/\Delta pH$ ) в растворах БСА меньше, чем в растворах САЧ для каждого соответствующего маркера.

Как видно из Рисунка 43, коэффициент кооперативности Хилла  $n$  при всех значениях рН для всех четырех наномаркеров имеет значения меньше 1, что явно меньше числа активных центров связывания на белке. Оценить кооперативные взаимодействия при образовании комплексов «белок-наномаркер» возможно с помощью коэффициента крутизны Кошланда  $R_x$ , связанного с коэффициентом Хилла следующим выражением  $R_x = 811/n$ . При полученных в данной работе значениях коэффициента Хилла, меньших 1,

значение коэффициента крутизны Кошланда будет явно больше 81, что говорит об отрицательной кооперативности в системе «БСА – наномаркер»

*Модель 3. Модель ассоциации лиганд-белок.*

Рассмотрена модель комплексообразования (ассоциации) лиганд – белок в рамках уравнений физической химии  $L + Q = QL$ , где лиганд L в нашем случае - это наномаркер, а Q - это макромолекула альбумина. Константу ассоциации наномаркера и альбумина назовем Ka. Тогда для концентраций лиганда и белка имеем такие соотношения:

$$[QL] = Ka \cdot [Q] \cdot [L],$$

$$[L_0] = [L] + [QL],$$

$$[Q_0] = [Q] + [QL],$$

где нулевой индекс означает исходную полную концентрацию молекул, которая складывается из концентраций свободных ( $[L]$ ,  $[Q]$ ) и связанных молекул ( $[QL]$ ).

Если принять стандартную гипотезу, что относительная флуоресценция свободного (не связанного) лиганда (наномаркера) пропорциональна его относительной концентрации, то можно получить следующую главную формулу:

$$1/r = 1 + Ka \cdot [Q_0] + Ka \cdot [L_0] \cdot (r - 1).$$

Здесь r,  $[Q_0]$ ,  $[L_0]$  – экспериментальные данные, из которых требуется найти Ka в зависимости от  $[Q_0]$  (в нашей работе  $[L_0] = 3$  мкМ, значения  $[Q_0]$  брались из диапазона 10 – 150 мкМ).

Особо отметим, что в отличие от часто использованного в литературе приближения  $[Q]=[Q_0]$ , здесь использованы более точные формулы, в которых делается отличие между полной концентрацией молекул белка  $[Q_0]$  и концентрацией свободных молекул белка  $[Q]$ .

Если взять данные по маркерам, то оказывается, что они хорошо укладываются в зависимость  $Ka = a / [Q_0]$ , то есть с ростом  $[Q_0]$  константа ассоциации Ka убывает по гиперболическому закону.

Параметр a – сродство лиганда к белку зависит от pH растворов (Рисунок 44). Видно что параметр a с ростом pH уменьшается приближенно по гиперболической функции (за исключением флуоресцеина).

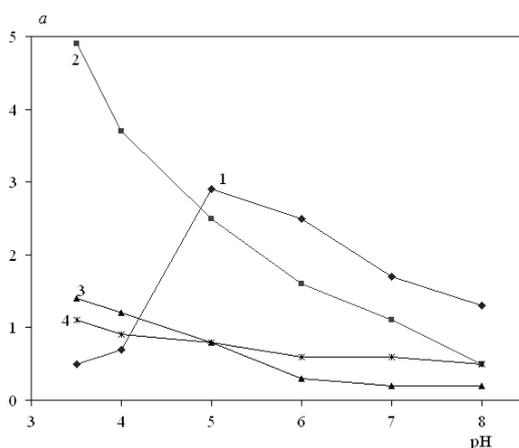


Рисунок 44. Зависимости параметра сродства  $a$  (в рамках Модели 3) наномаркеров к БСА от рН: 1 – флуоресцеин, 2 – эритрозин, 3 – эозин, 4 – бенгальский розовый.

Если подставить данный результат в главную формулу для  $\gamma$ , то мы видим, что с ростом концентрации белка ( $[Q0] \gg [L0]$ ) флуоресценция не гаснет, а стремится к минимальному ненулевому значению  $\gamma_{\min} = 1 / (1+a)$ .

Из приведенной формулы следует, что с увеличением рН, когда параметр сродства  $a$  уменьшается, величина относительной флуоресценции  $\gamma_{\min} = F_{\min}/F_0$  увеличивается.

Итак, вследствие уменьшения  $K_a$  с ростом  $[Q0]$  мы можем утверждать о существовании эффекта насыщения связей в системе наномаркер – белок, когда каждое последующее добавление белка в смесь ухудшает связывание. Этот вывод в рамках этой модели подтверждает вывод о существовании отрицательной кооперативности в процессе комплексообразования белок – лиганд, сделанный в предыдущей модели.

Уменьшение параметра сродства с ростом рН приближенно по гиперболической функции для производных флуоресцеина можно объяснить уменьшением электростатического взаимодействия белка с отрицательно заряженными лигандами. Следует отметить, что, так как комплексообразование лиганда с белком не исчезает при нулевом общем заряде на белке, когда  $pH = pI$ , то вклад в механизм комплексообразования лиганда с белком вносит не только электростатическое взаимодействие, но и другие виды взаимодействий (ковалентные, водородные, ван-дер-ваальсовы и др.).

## 1.2. Исследование механизмов деления клетки

### 1.2.1. Исследование свойств EB-белков в микротрубочках

Многие клеточные процессы, в том числе деление, миграция и поляризация, зависят от динамической нестабильности - уникального свойства тубулиновых микротрубочек, проявляющееся в их самопроизвольном переключении между фазами их роста и укорочения. В настоящее время лидирующая гипотеза состоит в том, что динамическая нестабильность объясняется наличием стабилизирующего колпачка на конце растущей микротрубочки, состоящего из ГТФ-связанных субъединиц тубулина. Пока стабилизирующий колпачок присутствует на кончике микротрубочки, микротрубочка может продолжать рост. Когда стабилизирующий колпачок утрачивается из-за стохастического гидролиза ГТФ, диссоциации ГТФ-тубулинов или потери боковых связей между ними, микротрубочка переходит в фазу деполимеризации. Структура и динамика этого стабилизирующего колпачка, однако, остается слабо исследованной из-за отсутствия прямых методов его визуализации. Специализированные антитела были разработаны для распознавания ГТФ-тубулинов, но из-за их большого размера и медленной кинетики отсоединения они не позволяли осуществить исследование динамики распределения нуклеотидов в микротрубочке с достаточно высоким временным разрешением. Важная информация о поведении ГТФ-колпачка пришла из исследований EB-белков (от End Binding), связывающихся с растущими концами микротрубочек, которые в настоящее время служат наилучшим известным нативным зондом для исследования стабилизирующего колпачка. Было показано, что EB-белки чувствуют нуклеотидное состояние тубулинов и распознают регион, ответственный за мгновенную стабильность микротрубочки *in vitro*. У млекопитающих семейство EB-белков представлено тремя членами — EB1, EB2 и EB3 — функционирующими как модуляторы динамики микротрубочки и платформы для привлечения многих других факторов на растущий конец микротрубочки. Исследования на клетках и на изолированных микротрубочках показали, что белки семейства EB декорируют кончики микротрубочек с комето-подобным распределением, слегка смещенным от самого кончика микротрубочки. Следуя предположению, что EB-белки распознают ГТФ/ГДФ-Рi связанный тубулин, переход которого в ГДФ-состояние является стохастическим процессом первого порядка, EB-профили на микротрубочках обычно усреднялись и аппроксимировались моно-экспоненциальной функцией затухания для извлечения характерной длины кометы во время фазы роста микротрубочки. Такой подход содержал информацию об усреднённых

свойствах колпачка на микротрубочках, но игнорировал потенциально важную информацию о более тонкой его структуре. А именно, индивидуальные профили EB обычно бывают шумными и содержат дополнительные пики, которые могут отражать наличие дополнительных зон, связывающих EB и, соответственно содержащих ГТФ/ГДФ-Ri связанный тубулин — так называемые «остатки» или «островки» ГТФ/ГДФ-Ri колпачка. Частота, положение и динамика этих зон, которые считаются важными факторами спасения микротрубочек, систематически не изучались.

В рамках данной работы мы провели анализ формы и динамики распределения EB3 на растущих микротрубочках в фибробластах с высоким временным разрешением. Мы обнаружили, что длина и форма кометы EB3 остаются в среднем неизменными в течение фазы роста микротрубочки, хотя и значительно колеблются. При этом отдельные распределения EB3 вдоль микротрубочки часто отклоняются от экспоненциальной формы, образуя относительно долгоживущие EB3-островки. Хорошо охарактеризованная кинетическая модель динамики микротрубочки, основанная на гипотезе двух состояний тубулина, модифицированная для отражения декорирования EB3, не смогла объяснить долгоживущие островки EB3, указывая на то, что дополнительные факторы способствуют связыванию EB3 с микротрубочкой.

Экспериментально установлено, что белок EB3 может связываться не только на конце микротрубочки, но и часто накапливается вдоль ее решетки, вблизи конца, образуя «островки». Это свидетельствует, что механизм локализации белка EB3 более сложный, чем предполагали классические модели. А также дает ключ к пониманию необычной динамики и частых остановок деполимеризации концов микротрубочек в живых клетках.

Форма дополнительных зон связывания EB3 была разнообразной и часто представляла собой или диффузное расширение профиля кометы EB3-RFP (Рисунок 45, фигурная скобка), или же четкие участки дополнительной интенсивности EB3-RFP, которые мы впоследствии и будем называть островками EB3 (Рисунок 45, оранжевые стрелки).

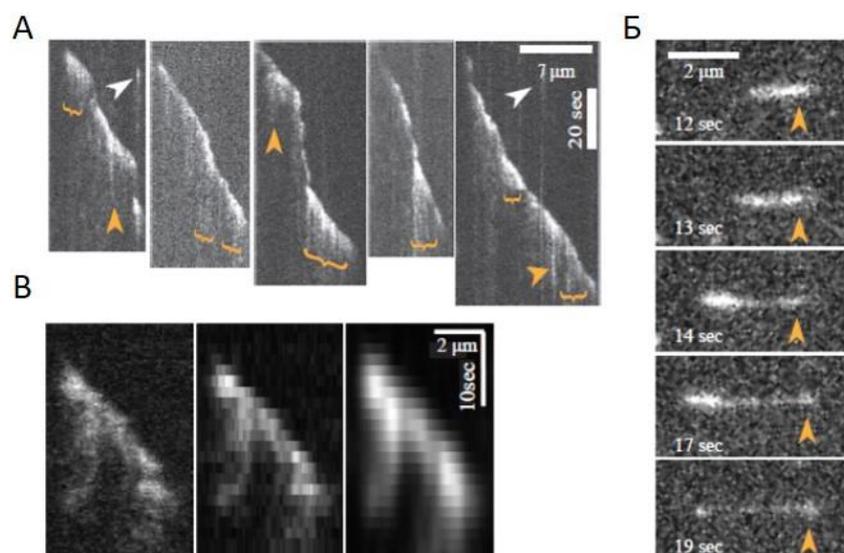


Рисунок 45. Обнаружение EB3 островков вблизи растущих концов микротрубочек. (А) Примеры кимограмм, плохо описываемых кусочно-экспоненциальной / гауссовой функцией. Желтые стрелки отмечают EB3-островки. (Б) Сравнение количества флуоресцентных пятен на микротрубочках по сравнению с фоном. (В) Слева направо: необработанная кимограмма EB3-RFP на микротрубочке, та же кимограмма с 1-секундным биннингом и сглаженная 2D-гауссовым фильтром (радиус фильтра = 1,5 пикселя).

Мы могли однозначно идентифицировать достаточно большие EB3-островки, используя автоматизированный алгоритм. Наш подход к идентификации островков EB3 основывался на подборе профиля интенсивности EB3-RFP с помощью функций с одним и несколькими пиками. Если совпадение для функции с большим количеством пиков показывало значительное улучшение по сравнению с функцией с единичным экспоненциальным/гауссовым пиком, мы определяли профиль как содержащий островок EB3. В целом, мы количественно охарактеризовали 82 EB3-островка на 120 микротрубочках в живых клетках фибробластов. Длительности жизни островков EB3 были распределены экспоненциально с периодом полураспада 5,1 секунд. Наблюдаемые EB3-островки не следовали за основным пиком интенсивности кометы EB3-RFP, а оставались неподвижными на микротрубочке, становясь все более удаленными от основной кометы с течением времени. EB3-островки появлялись в среднем один раз в 44 секунды времени роста кометы EB3-RFP, что соответствует пространственной частоте в один EB3-островок на 9,3 микрометра длины микротрубочки. Мы не наблюдали какой-либо четкой тенденции по части обогащения EB3-островками у более молодых или более старых комет, что позволяет предположить, что их появление было случайным.

Аналогично, не было никакой корреляции между частотой образования островков EB3 и скоростью соответствующих комет EB3-RFP.

Впервые показано, что один из основных регуляторов микротрубочек, белок EB3 локализуется не только на концах микротрубочек, но и формирует вторичные зоны связывания с периодом полураспада 5,1 сек и частотой встречаемости каждые 9,3 мкм длины микротрубочек.

Несмотря на хорошую аппроксимацию усредненного профиля EB3-RFP комбинацией гауссовой и экспоненциальной функций (Рисунок 46), мы обнаружили, что многие индивидуальные профили значительно отклоняются от этой модели.

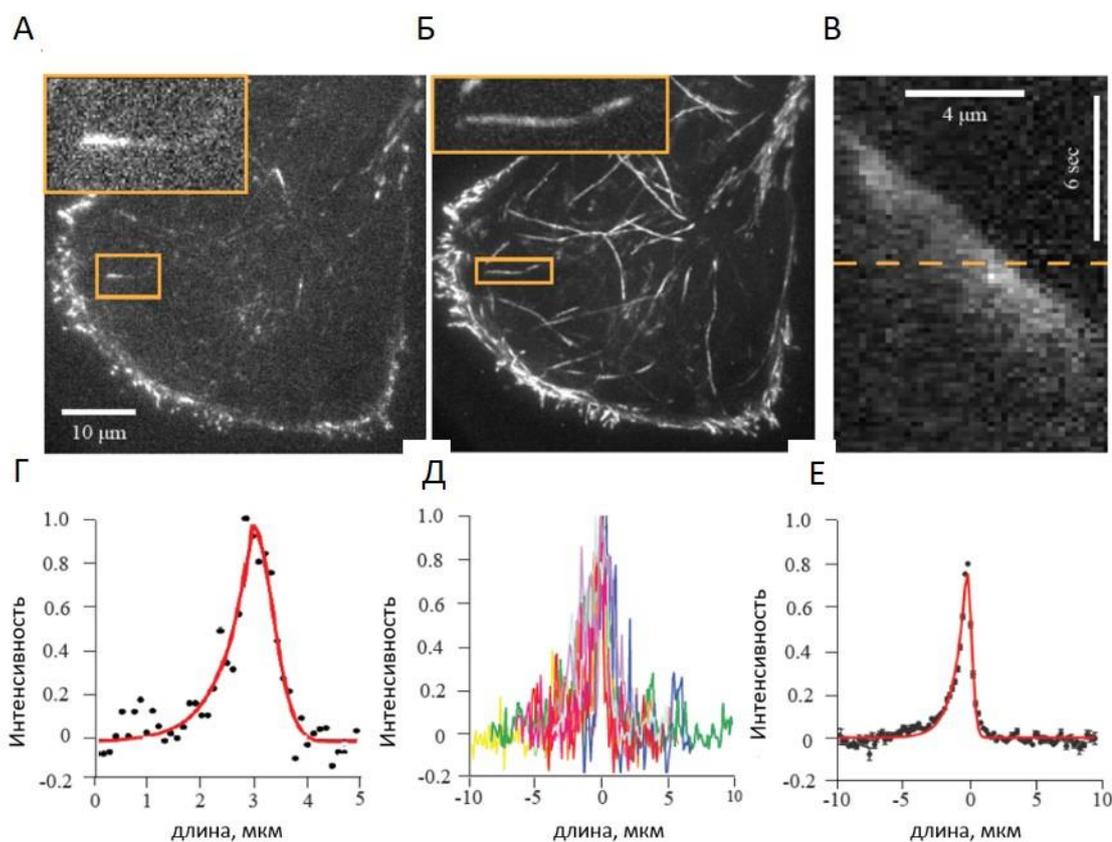


Рисунок 46. Обработка профилей интенсивности вдоль треков EB3 в фибробластах. (A) Снимок фибробластов 3Т3, экспрессирующих кометы EB3-RFP. Врезка увеличивает отдельную комету (B) Максимальная проекция стека кадров, визуализирующая различные треки EB3-RFP. (C) Пример кимограммы EB3-RFP, взятый вдоль дорожки, выделенной желтым цветом на панели B. (D) Профиль интенсивности вдоль пунктирной линии панели C. Красный цвет показывает соответствие экспоненциальной / гауссовой функции. (E) Индивидуальные профили интенсивности EB3-RFP выровнены по положению максимума функции подгонки (см. Методы). (F) Усредненный профиль интенсивности EB3-RFP, аппроксимированный кусочно-экспоненциальной / гауссовой функцией (красный).

Было продемонстрировано, что дополнительные зоны связывания белка EB3, т.н. «EB3 островки» располагаются не только на пересечениях с другими микротрубочками, поэтому не могут быть целиком обусловлены такими пересечениями (Рисунок 47).

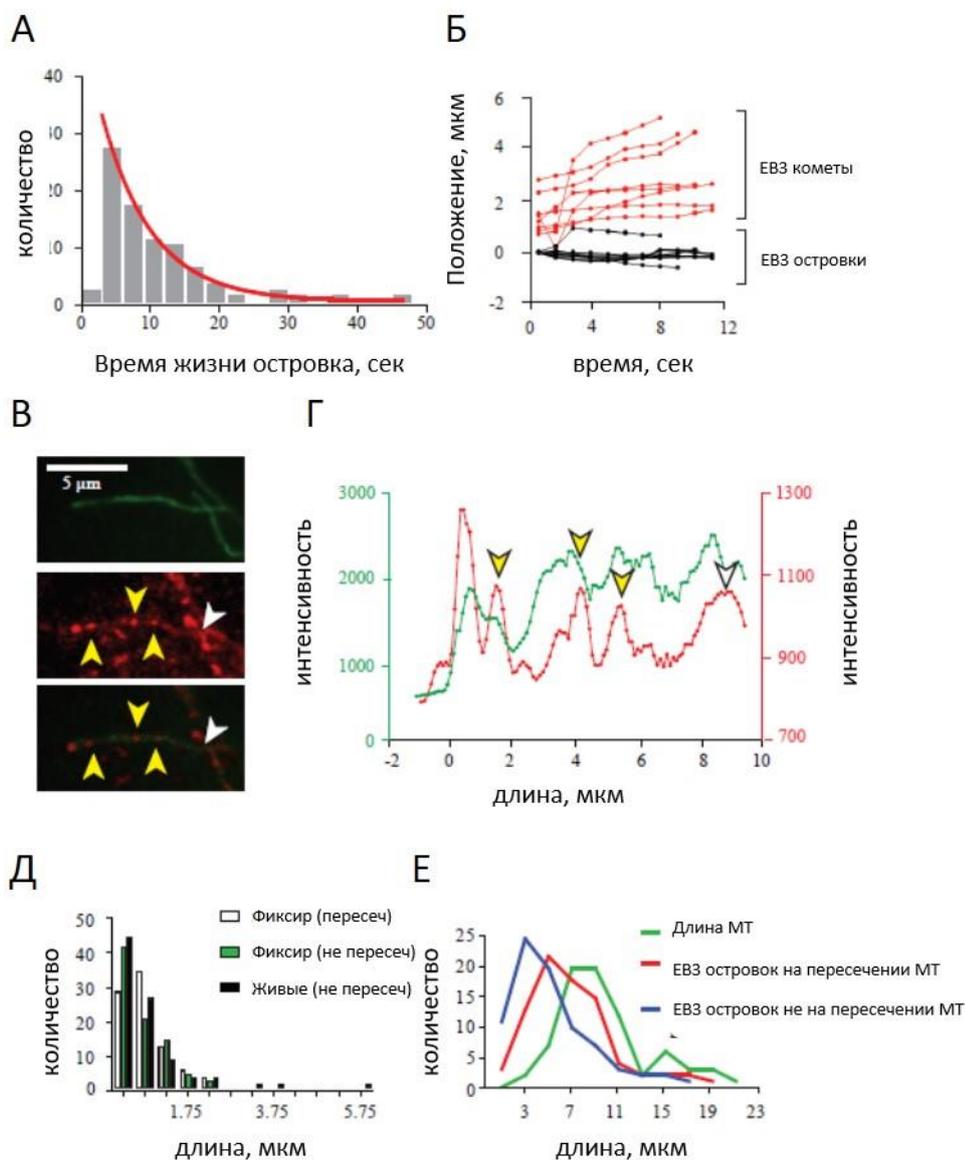


Рисунок 47. Количественная оценка EB3-островков. (А) Распределение времен жизни EB3-островков (черные столбцы). Красная кривая – экспоненциальная аппроксимация. (Б) График зависимости положения от времени для восьми репрезентативных треков комет EB3-RFP (красный) и островков EB3 (черный) на одних и тех же кимограммах, показывающий, что кометы EB3-RFP движутся с растущей вершиной микротрубочке, в то время как EB3-островки остаются статичными. (В) Микротрубочки и EB3 видны в отдельных спектральных каналах и наложены друг на друга. Желтые стрелки указывают на островки EB3 вне пересечений с микротрубочками, белые стрелки указывают на островки EB3 на пересечениях микротрубочек. (Г) Профиль интенсивности тубулина и сигнала EB3 вдоль микротрубочек. Стрелки окрашены, как на

панели С. (Д) Распределение длин островков EB3. Белые, зеленые и черные столбцы соответствуют EB3-островкам, расположенным на пересечениях микротрубочек в фиксированных ячейках, вне пересечений микротрубочек в фиксированных ячейках и в живых клетках соответственно. (Е) Распределение местоположений островков EB3 относительно растущей вершины микротрубочки. Красные и синие кривые соответствуют EB3-островкам на пересечениях микротрубочек и вне пересечений микротрубочек, соответственно. Зеленая кривая показывает распределение длин сегментов микротрубочек, которые были проанализированы.

С помощью компьютерного моделирования было показано, что простой кинетики гидролиза ГТФ в карманах тубулина не достаточно для того, чтобы объяснить стохастическое возникновение ГТФ-островков (Рисунок 48).

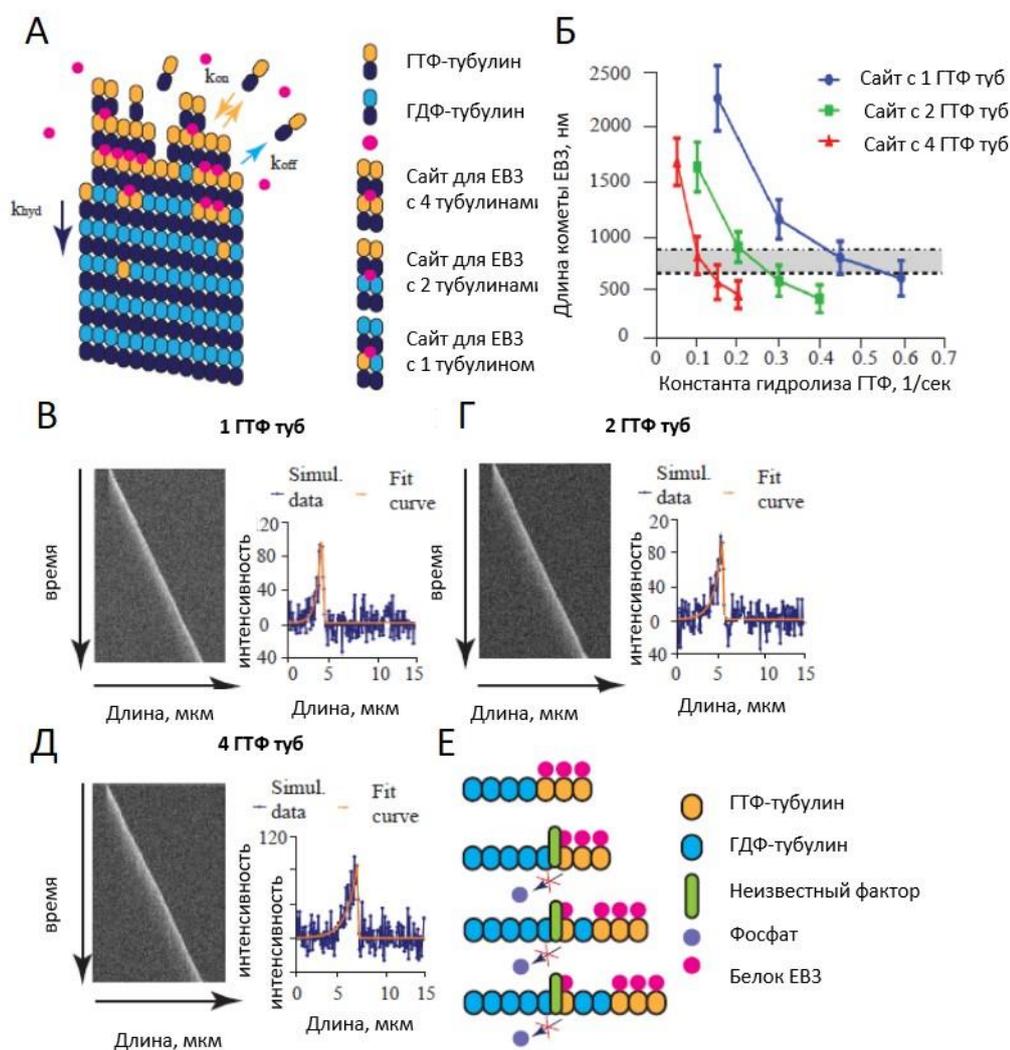


Рисунок 48. Анализ потенциального механизма формирования EB3-островков. (А) Схема вычислительной модели растущего кончика микротрубочки с белками EB3. (Б) Зависимость длины кометы EB3 в модели как функция константы гидролиза ГТФ. Кривые

разных цветов соответствуют различным правилам связывания EB3 и тубулина. Серая область между пунктирными линиями представляет диапазон экспериментально оцененной длины кометы. (B) - (D): репрезентативные кимограммы комет EB3 при моделировании с различными значениями констант гидролиза GTP и соответствующими репрезентативными профилями интенсивности. Оранжевый подходит с экспоненциальной / гауссовой функцией. (E) Схема гипотетического механизма формирования островка EB3

### **1.2.2. Исследования одиночных молекул комплекса NDC80 и ансамблей данного белка и его мутантов с динамическими концами микротрубочек**

Для обеспечения точности разделения удвоенных хромосом во время митоза, взаимодействие крупных макромолекулярных комплексов на хромосомах - кинетохоров и концов микротрубочек в клетке тщательно регулируется. Возникающие в процессе митоза «ошибочные» закрепления микротрубочек за кинетохор, ведущие к непродуктивным и «неправильным» перемещениям сестринских хромосом к одному и тому же полюсу деления, должны дестабилизироваться, тогда как «правильные» взаимодействия, ведущие к точному распределению сестринских хроматид между дочерними клетками, должны наоборот избирательно сохраняться. Механизм такой «разборчивости» клетки на уровне макромолекул зависит от посттрансляционных модификаций кинетохора и микротрубочек. Особую роль играет фосфорилирование кинетохорных белков киназой Аврора Б. Наибольшая активность киназы Аврора Б наблюдается в области между кинетохорами. При связывании с двумя сестринскими кинетохорами микротрубочки, закрепленные за противоположные полюса деления, растягивают кинетохоры, выводя молекулы кинетохора, главным образом ключевого кинетохорного комплекса NDC80, за пределы действия киназы. За счет этого молекулы NDC80 перестают подвергаться фосфорилированию и быстро теряют фосфаты за счет действия растворенной в цитоплазме фосфатазы. Де-фосфорилированные комплексы NDC80 взаимодействуют с микротрубочками с более высокой аффинностью, что приводит к стабилизации «правильных» закреплений, обеспечивающих натяжение на кинетохоре. Несмотря на то, что этот базовый принцип регуляции получил экспериментальное подтверждение в последних исследованиях, молекулярные детали его работы все еще непонятны. Таким образом определение механизма закрепления кинетохора хромосом за динамический плюс-конец микротрубочки и надежного поддержания данного закрепления под действием сил, необходимых для корректного прохождения клеточного деления остается актуальным и нерешенным вопросом.

Стеклянные микросферы покрывали антителами к зеленому флуоресцентному белку, GFP и иммобилизовали на поверхности покровного стекла проточной микроскопной камеры. Для блокировки неспецифических взаимодействий, покровное стекло силанизировано и покрыто блокирующим агентом Pluronic F127. Далее на микросферы наносили очищенные рекомбинантные белки NDC80-GFP моторный белок CENP-E в концентрациях, соответствующих малому количеству молекул на микросферу (Рисунок 49). Далее в проточную камеру вводили заправки микротрубочек, стабилизированные негидролизующим аналогом ГТФ – GMPCPP. В присутствии растворимого меченного родамином тубулина и ГТФ из данных заливок полимеризовали микротрубочки. Взаимодействие микротрубочек с микросферами, покрытыми белком наблюдали с помощью флуоресцентной микроскопии.

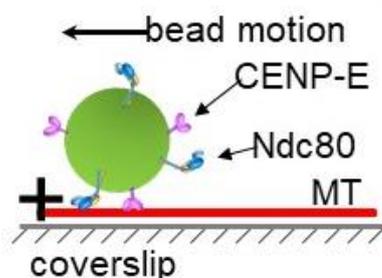


Рисунок 49. Схема эксперимента по взаимодействию белков NDC-80 и CENP-E, иммобилизованными на микросферах, с микротрубочкой.

Ndc80 оказывает молекулярное трение при движении микросферы по поверхности МТ под действием моторного белка CENP-E. Полноценный CENP-E может пройти до плюс-конца микротрубочки и недолго (<20 с) поддерживать связь с МТ благодаря МТ-связывающему домену в его хвостовой области. Чтобы определить, как Ndc80 влияет на движение CENP-E в отсутствие этого домена, мы использовали усеченную версию CENP-E, которая не задерживается на концах МТ, но по стенке МТ она идет и реагирует на силу аналогично полноразмерному белку. Стеклянные шарики, покрытые этими моторными доменами (далее называемые «мотор CENP-E»), также были покрыты очищенными комплексами Ndc80 (Broscoli) содержащими МТ-связывающие домены дикого типа. Используя лазерную ловушку, мы захватывали и приносили такой шарик к стенке стабилизированной таксолом МТ, лежащей на покровном стекле (Рисунок 49). При наличии большого количества Ndc80 микросферы имеют тенденцию останавливаться на конце МТ, и задерживаться там на все большее время. Тем не менее, микросферы двигались медленнее, и многие из них не могли добраться до МТ-плюс конца.

Наш новый метод показывает, что мотор CENP-E и комплекс Ndc80 представляют собой оптимально устроенную молекулярную систему, способную к конверсии кинетохора из латерального в концевое закрепление *in vitro*. Во время латерального движения Ndc80, связывающийся с стенкой МТ, создает сопротивление, которое противодействует движению мотора CENP-E. Мы полагаем, что в 10 раз меньшая скорость конгрессии хромосом по сравнению со скоростью свободно движущегося CENP-E, является результатом молекулярного трения кинетохорных комплексов Ndc80. При достижении плюс конца МТ, CENP-E и Ndc80 генерируют физиологически значимое сильное связывание с МТ, что следует из того факта, что это закрепление способно выдерживать несколько динамических циклов полимеризации – дполимеризации связанного конца МТ. Такое закрепление может длиться десятки минут.

Мы провели сравнительное исследование этого феномена для ряда модифицированных и мутантных форм комплекса Ndc80: Ndc80 Broccoli, Ndc80 Bonsai, мутантами  $\Delta 1-80$  Ndc80 Bonsai, или K166D Ndc80 Bonsai (Рисунок 50). Успешным переходом в торцевое закрепление считалась ситуация, когда микротрубочка оставалась закрепленной за микросферу в течение не менее чем 4 с. Все белки Ndc80 показали высокий процент перехода в торцевое закрепление, но длительность этого закрепления была сильно разной для разных форм белка.

Кривая выживания Kaplan–Meier для удержания микротрубочки в торцевом закреплении показывает, насколько сильно комплекс Ndc80 увеличивает способность микротрубочки оставаться закрепленной за микросферу.

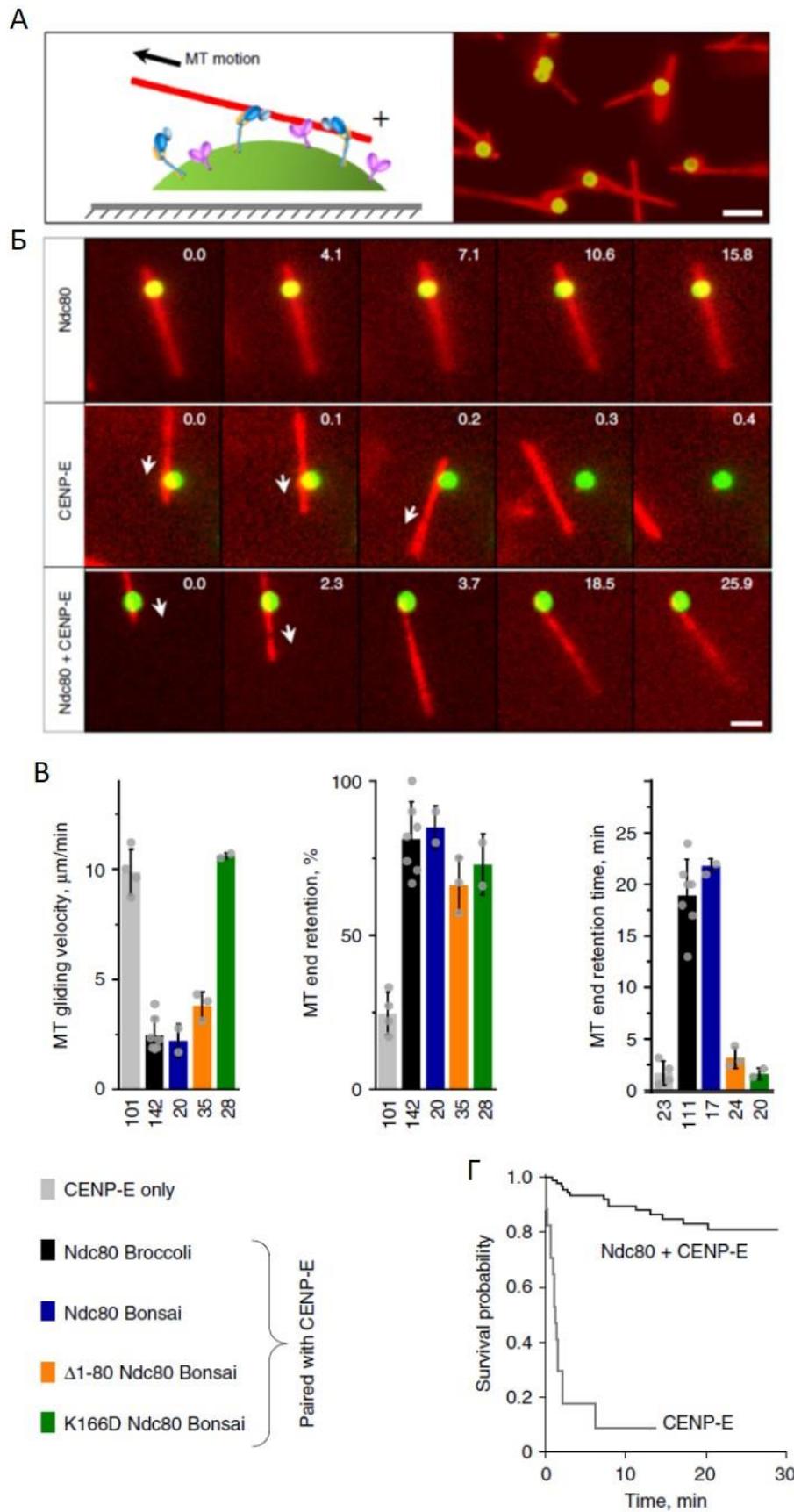


Рисунок 50. Переход микротрубочки из латерального в концевое закрепление под действием комплекса NDC-80 и моторного белка CENP E. (A) Схематическое представление эксперимента и репрезентативное изображение поля с GMPCPP-

стабилизированными микротрубочками (красные) and иммобилизированными на покровном стекле микросферами, покрытыми GFP- меченным комплексом Ndc80 (зеленые). Bar - 3  $\mu\text{m}$ . (Б) Серия изображений, показывающая движение микротрубочки на иммобилизованной микросфере. Время в минутах от начала наблюдения. Стрелки указывают направление движения микротрубочек. Bar, 3  $\mu\text{m}$ . (В) Количественная обработка экспериментов по переходу микротрубочек из латерального в концевое закрепление в опытах со смесью моторов CENP-E и разных мутантов Ndc80. Колонки представляют среднее  $\pm$  SD для N независимых опытов, которые показаны серыми точками. Колонки слева направо представляют только CENP-E, CENP-E в комбинации с генноинженерными версиями Ndc80 Broccoli, Ndc80 Bonsai, мутантами  $\Delta 1-80$  Ndc80 Bonsai, или K166D Ndc80 Bonsai, N = 4, 7, 2, 3, and 2, соответственно. Общее количество проанализированных микротрубочек во всех опытах указано внизу под колонками. Успешным переходом в торцевое закрепление считалась ситуация, когда микротрубочка оставалась закрепленной за микросферу в течение не менее чем 4 с. Все белки Ndc80 показали высокий процент перехода в торцевое закрепление, но длительность этого закрепления была сильно разной для разных форм белка. (Д) Кривая выживания Kaplan–Meier для удержания микротрубочки в торцевом закреплении. N независимых опытов в каждом из которых наблюдали за концевым закреплением n MTs: CENP-E мотор: N = 4, n = 23; Ndc80+CENP-E, N = 7, n = 111

Основные постулаты, заложенные в модель, изображены на Рисунке 51 и описаны в подписи к рисунку.

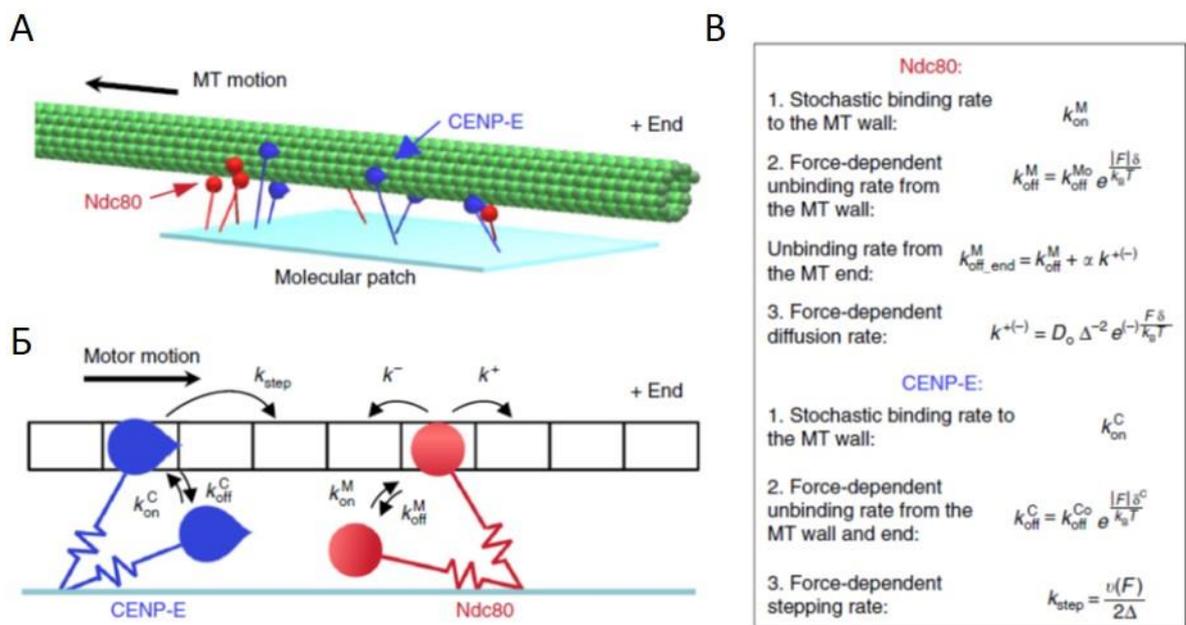


Рисунок 51. Математическая модель молекулярного ансамбля моторов и диффундирующих белков, связывающихся с микротрубочками (MAPs).

(А) Множественные MAP-ы (красные) и моторы (голубые) случайно распределены по поверхности, образуя молекулярный газон. Стабилизированные микротрубочки двигаются под действием сил, развиваемых кинезиновыми моторами в присутствии тепловых шумов. (Б), (В) Таблица кинетических переходов. Молекулы связываются стохастически с сайтами связывания, расположенными на стенке микротрубочки с шагом 4 nm, а их отсоединение происходит под действием сил, развиваемых моторами. Вероятность мотора сделать шаг, как и вероятность диффузионных шагов MAP-ов также зависят от приложенных сил. Вероятность отсоединения мотора от конца микротрубочки такова же, как и вероятность отсоединения от стенки микротрубочки. MAP-ы могут полностью отсоединиться от конца микротрубочки или продолжать по ней диффундировать.

Комбинирование моторов CENP-E и молекул Ndc80 в рамках модели выявило динамичное и сложное поведение этого ансамбля. Микротрубочка очень редко скользит в состояние, когда она связана на конце всего с одним мотором, поскольку по мере того, как уменьшается число связанных моторов, им становится все труднее преодолевать сопротивление молекул Ndc80, связанных с микротрубочкой. Поэтому моторы чаще отсоединяются. Однако, конец микротрубочки остается закрепленным, и даже несколько отъезжает от края благодаря диффузии оставшихся присоединенными молекул Ndc80. Однако, если большинство или даже все молекулы Ndc80 отсоединяются, моторы возобновляют свое однонаправленное движение, пытаясь уменьшить область взаимодействия. Это, в свою очередь, уменьшает число моторов и увеличивает пропорцию в пользу молекул Ndc80. Микротрубочка тормозится и цикл начинается снова. Поскольку в процесс вовлечено много молекул и их движения и тепловые флуктуации крайне нерегулярны, в каждый момент времени во взаимодействии участвует очень разное число молекул. Важно то, что такой комплекс может поддерживать связанное состояние даже с небольшим участком (20–40 нм) в течение значительного времени (70% взаимодействий продолжаются более 30 мин), что хорошо согласуется с нашими экспериментами. Таким образом, наш эксперимент вкупе с моделированием показывает, что переход из латерального в концевое положение и долгое удержание в этом положении может осуществлять комплекс белков, не имеющих никакого предпочтительного средства к концу микротрубочки.

Проведенное исследование показало, что кинетохорный молекулярный комплекс Ndc80 резко увеличивает удержание микросферы (хромосомы). Отработаны все необходимые процессы выделения, очистки белков, их иммобилизации и наблюдения за динамикой взаимодействия белковых комплексов динамическом конце микротрубочки как в процессе полимеризации микротрубочки, так и в процессе деполимеризации. Эта информация дает молекулярную интерпретацию событий, происходящих в метафазе митоза и имеет большое значение для понимания всего процесса в целом.

## 2. Выявление и изучение неблагоприятных факторов внешней среды, образа жизни и полиморфизма генов, определяющих предрасположенность к возникновению мультифакторных заболеваний как основа предиктивной медицины

### 2.1. Новые методы диагностики заболеваний системы кроветворения

#### 2.1.1. Разработка критериев дифференциальной диагностики ОМЛ на основе данных о морфологии, цитохимии и наборе дифференцировочных антигенов, присутствующем на поверхности опухолевых клеток, определяемых с помощью клеточного биочипа

В качестве критерия наличия острого лейкоза в стандартной диагностике используется доля бластных клеток среди всех ядерных клеток в пунктате костного мозга. С помощью клеточного биочипа были исследованы мононуклеары пунктатов костного мозга 116 пациентов с подозрением на острый лейкоз, 11 пациентов с подозрением на хронический лейкоз, 4 пациентов с ОМЛ в состоянии ремиссии и 20 здоровых доноров и определена доля клеток с бластной морфологией среди всех мононуклеаров, связавшихся на биочипе с антителами к CD45 и CD45RA. Результаты анализа для CD45RA+ клеток представлены на Рисунке 52.

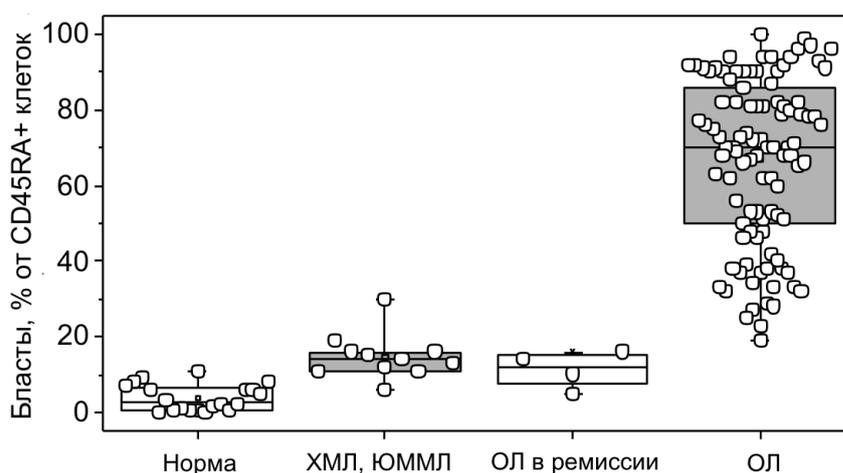


Рисунок 52. Доля клеток с бластной морфологией от всех мононуклеаров, связавшихся на биочипе с анти-CD45RA, для 20 здоровых доноров (норма), 3 пациентов с ХМЛ, 8 с ЮММЛ, 116 пациентов с острыми лейкозами (ОЛ) и 4 пациентов с ОМЛ в состоянии ремиссии.

Анализ представленных на Рисунке 52 данных показывает, что в качестве критерия наличия острого лейкоза может быть использована доля клеток с бластной морфологии среди связавшихся с анти-CD45RA. На Рисунке 53 представлены результаты ROC-анализа (зависимости чувствительности от 1-специфичности при различных значениях порогового значения доли бластных клеток, определяющего наличие острого лейкоза). Площадь под ROC-кривой составила 0,976, что свидетельствует о том, что доля бластных клеток, связавшихся с анти-CD45RA, является хорошим критерием определения наличия острого лейкоза. Пороговое значение доли бластных клеток для наличия острого лейкоза определяется как точка пересечения значений кривых чувствительности и специфичности (Рисунок 53 Б) и составляет 25%.

Порог по проценту бластов на клеточном биочипе для острых лейкозов составил 25%, то есть если у пациента процент бластов, связавшихся на биочипе с анти-CD45 или анти-CD45RA 25% и более, то у пациента острый лейкоз.

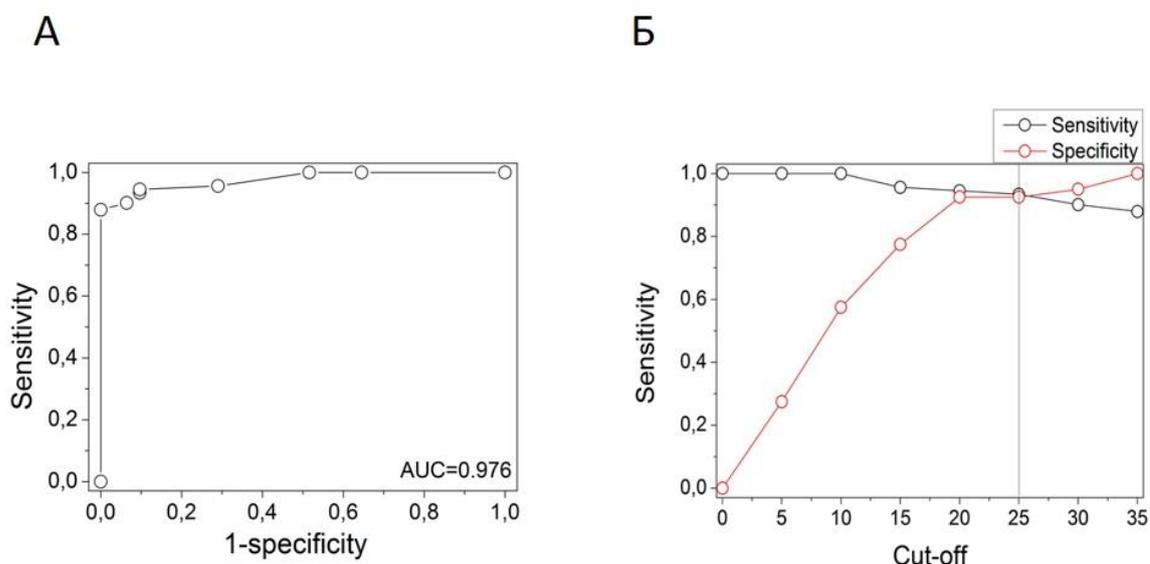


Рисунок 53. (А) ROC-кривая по проценту бластога (зависимость чувствительности от 100-специфичности). Площадь под кривой 0,976. (Б) Определение порога по бластога для острого лейкоза - 25% бластов пороговое значение для острых лейкозов, если у пациента процент бластов больше или равен 25%, то у него острый лейкоз.

Для определения линейности острого лейкоза с помощью клеточного биочипа была предложена система балльная система, рассчитываемая с учетом наличия или отсутствия связывания клеток с бластной морфологией с антителами к поверхностным дифференцировочным антигенам лейкоцитов в соответствии с Таблицей 1.

Таблица 1. Балльная система для экспрессии поверхностных CD-антигенов на поверхности бластов для определения линейности острого лейкоза. Миеломоноцитарный и В-лимфоидный баллы.

Баллы	Миелоидные	Моноцитарные	В-лимфоцитарные
1	CD13, CD33, CD117	CD11c, CD14, CD64	CD10, CD19, CD22
0.5	CD11b, CD15	-	-

На основании этой балльной системы для каждого пациента в зависимости от того с какими анти-CDx связались бласты на клеточном биочипе, был определен миеломоноцитарный балл (сумма миелоидных и моноцитарных баллов, начисленных за экспрессию на бластах соответствующих CDx) и В-балл (сумма В-лимфоцитарных баллов). Эта сумма баллов для пациентов с ОМЛ была проанализирована при помощи ROC-анализа. Результаты ROC-анализа для суммы миеломоноцитарных баллов у пациентов с ОМЛ представлена на Рисунке 54.

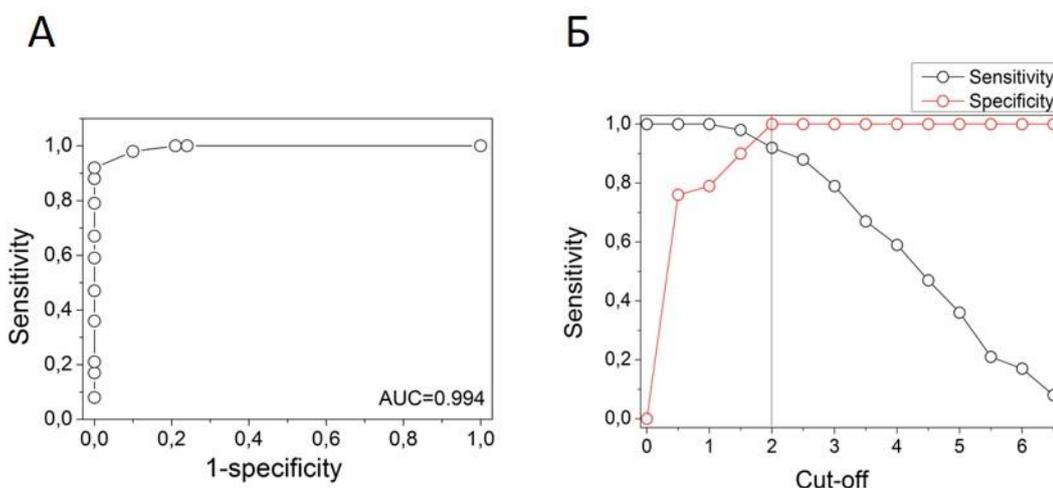


Рисунок 54. (А) ROC-кривая по миеломоноцитарному баллу (ММ) для пациентов с ОМЛ.

Площадь под кривой 0,994. (Б) Определение порога по миеломоноцитарному баллу для острого лейкоза – ММ=2 пороговое значение для острых лейкозов, если у пациента с острым лейкозом бласты экспрессируют миелоидные и/или моноцитарные CDx на ММ $\geq$ 2, то у него острый миелоидный лейкоз (ОМЛ).

Площадь под ROC-кривой составила 0,994, значит миеломоноцитарный балл (ММ) – отличный диагностический параметр для установления диагноза острый миелоидный лейкоз. Пороговое значение для миеломоноцитарного балла для ОМЛ ММ=2 (Рисунок 54 Б). Таким образом, если у пациента с острым лейкозом бласты, связываются на клеточном

биочипе с антителами к миелоидным и моноцитарным анти-CDx на  $MM \geq 2$ , то у него острый миелоидный лейкоз.

Анализ миелоидных, моноцитарных и В-лимфоцитарных баллов, рассчитанных для 69 пациентов с диагнозом «острый миелоидный лейкоз» и 29 пациентов с диагнозом «острый В-лимфобластный лейкоз», установленным стандартными методами в НМИЦ ДГОИ им. Дм. Рогачева, показал, что в качестве критерия наличия В-лимфобластного лейкоза можно использовать В-лимфоцитарный балл больше либо равный 2. Данный критерий обладает чувствительностью 98% и специфичностью 100%. Миеломоноцитарный балл составлял от 0 до 2.5 для острых лимфобластных лейкозов и от 1 до 7 для острых миелобластных лейкозов, и использование миеломоноцитарного балла, большего либо равного двух, для выделения пациентов с подвидами ОМЛ М1, М2, М3, М4 и М5 давало в исследованной нами выборке чувствительность 97% и специфичность 98%.

Для установления подвида ОМЛ по FAB-классификации использовались результаты цитохимического анализа на две эстеразы нафтол- AS-D-хлорацетатэстеразы и  $\alpha$ -нафтилбутиратэстеразы на клеточном биочипе. В 1973 году С.У. Li с соавторами при разделении экстрактов нормальных и патологических лимфоцитов выделили две основные группы эстераз: соответствующие нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразе (специфической эстеразе) и  $\alpha$ -нафтилбутиратэстеразе (неспецифическая эстераза, способная расщеплять как  $\alpha$ -нафтилбутират, так и  $\alpha$ -нафтилацетат). В той же работе было показано, что в зрелых и созревающих гранулоцитах наиболее активны специфические эстеразы, а в зрелых моноцитах неспецифические, что позволяет использовать анализ на эти эстеразы для разделения гранулоцитарного и моноцитарного ростка при диагностике ОМЛ. В нашей работе мы анализировали цитохимическую окраску на две эстеразы клеток, связавшихся с анти-CD45RA, так как ранее было показано, что именно с этим антителом на биочипе часто связывается наибольшее количество бластов и в норме большинство клеток, связавшихся с этим пятном, отрицательны по обеим эстеразам. Усредненное распределение окраски на две эстеразы в норме и при острых лейкозах в пятне анти-CD45RA представлено на Рисунке 55.

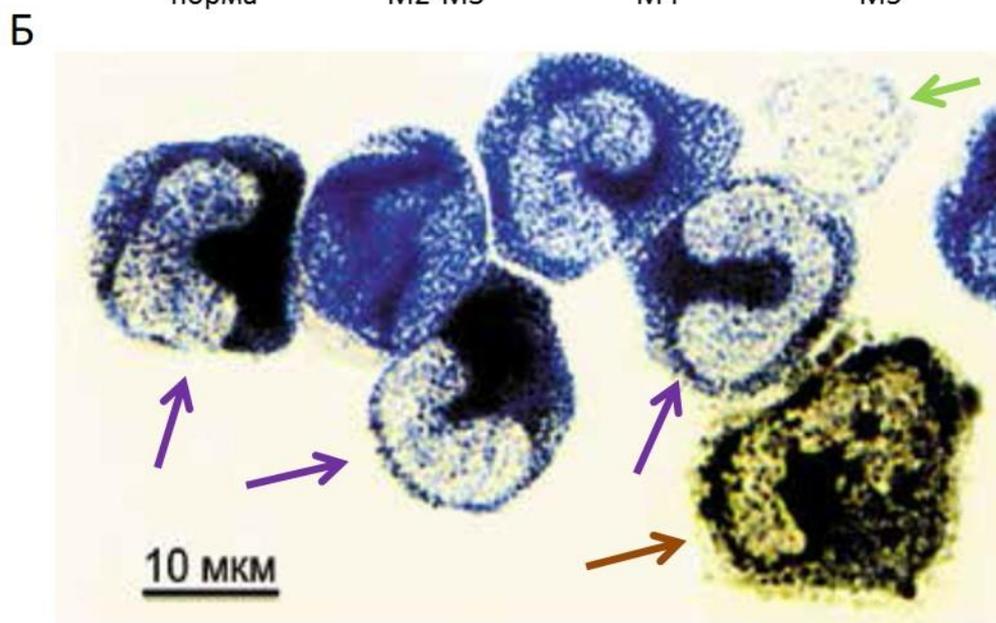
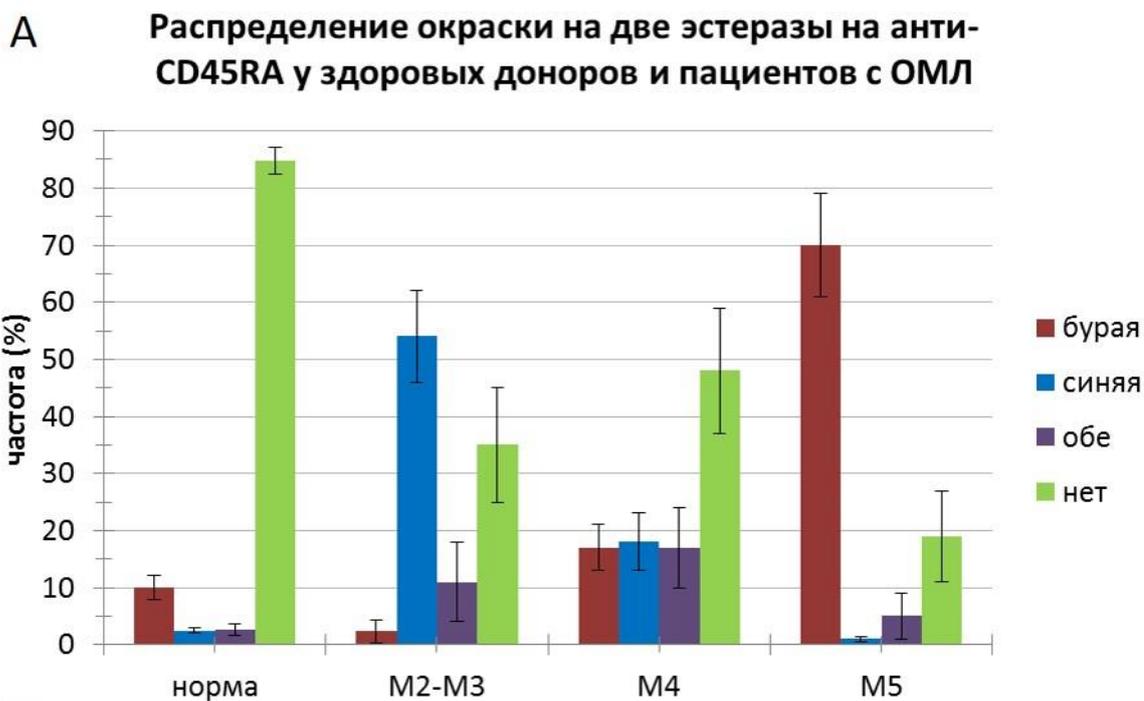


Рисунок 55. (А) Диаграмма распределения предшественников лейкоцитов в пятне биочипа анти-CD45RA по наличию в них  $\alpha$ -нафтилбутиратэстеразы и нафтол-ASD-хлорацетатэстеразы в норме и при разных подтипах ОМЛ. Представлены усредненные значения по 11 донорам, 6 пациентам с M2-M3, 7 пациентов с M4 и 9 пациентов с M5 в качестве ошибки взята ошибка среднего. (Б) Мононуклеары нормального костного мозга, связавшиеся с иммобилизованным антителом к CD11b, окрашенные на  $\alpha$ -нафтилбутиратэстеразу и нафтол-AS-D-хлорацетат эстеразу. Клетка с бурой окраской, несущая  $\alpha$ -нафтилбутиратэстеразу, указана коричневой стрелкой; неокрашенная клетка – зеленой; клетки с двойной окраской, содержащие обе эстеразы, – фиолетовыми стрелками;

клетки с синей или фиолетовой окраской, несущие нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразу, не отмечены ( $\times 1000$ )

На основании полученных данных может быть предложен следующий алгоритм использования клеточного биочипа в морфологической диагностике острых лейкозов.

1. Суспензия мононуклеарных клеток, выделенных из пунктата костного мозга пациента, инкубируется с клеточным биочипом, и после отмывки неспецифически связавшихся клеток биочип высушивается и окрашивается для морфологического исследования. На первом этапе проводится подсчет доли клеток с бластной морфологией среди всех лейкоцитов, связавшихся с антителом к CD45RA. В случае, если количество бластов превышает 25% от всех клеток, связавшихся с анти-CD45RA, у пациента предполагают острый лейкоз.

2. Для определения линейности лейкоза далее исследуется наличие бластов, связавшихся со всеми иммобилизованными на биочипе антителами. Если клетки с бластной морфологией составляют более 2% от всех клеток, связавшихся с данным антителом, предполагают, что опухолевая популяция положительна по соответствующему антигену.

3. При связывании бластных клеток с антителами к любым двум антигенам из числа CD10, CD19 и CD22 у пациента предполагают острый В-лимфобластный лейкоз. Исследование 124 пунктатов костного мозга пациентов с ОЛ с помощью клеточного биочипа показало, что данный критерий обладает чувствительностью 98% и специфичностью 100%.

4. Для выделения группы острых Т-лимфобластных лейкозов может быть использовано наличие связывания бластов с антителами к CD7, CD5, CD1a, CD2 и CD3 и критерии, описанные в литературе [1, 11], однако чувствительность и специфичность данных критериев не определялась в связи с малым количеством исследованных пациентов (4 из 177).

5. Связывание бластных клеток с антителом к любому из антигенов CD41 или CD61 позволяет поставить пациенту диагноз острый мегакариоцитарный лейкоз (ОМЛ M7) с чувствительностью 91% и специфичностью 100%.

6. Для выделения группы острых миелоидных лейкозов исследуется положительность бластной популяции по CD антигенам, специфичным для клеток миелоидной и/или моноцитарной линий дифференцировки и экспрессируемым на опухолевых клетках при ОМЛ (CD11c, CD13, CD13, CD14, CD33, CD64, CD117) [12, 13], а также CD11b и CD15, преимущественно экспрессируемым на миелоидных и

моноцитарных клетках, но не являющихся абсолютно специфичными для них [11, 12]. Для проведения данного анализа может быть рассчитан так называемый миеломоноцитарный балл исследуемого острого лейкоза, составляющий сумму единиц, начисляемых за связывание бластов на биочипе с антителами к каждому из антигенов CD11c, CD13, CD13, CD14, CD33, CD64, CD117, и по 0.5 балла за связывание бластов с анти-CD11b или CD15. Рассчитанный на основании анализа пунктата костного мозга с помощью клеточного биочипа миеломоноцитарный балл составлял от 0 до 2.5 для острых лимфобластных лейкозов и от 1 до 7 для острых миелобластных лейкозов, причем использование миеломоноцитарного балла, большего либо равного двум, для выделения пациентов с подвидами ОМЛ М1, М2, М3, М4 и М5 давало в исследованной нами выборке чувствительность 97% и специфичность 98%. Дальнейшая дифференцировка подвидов ОМЛ может быть проведена с помощью анализа на активность ферментов, специфичных для клеток миелоидного ряда (неспецифической эстеразы и миелопероксидазы или специфической эстеразы).

### **2.1.2. Разработка новых тест-систем для диагностики заболеваний системы комплемента и испытаний новых фармакологических препаратов**

Нарушения в работе системы комплемента могут приводить развитию смертельно опасных заболеваний, таких как атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС), пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) и проч. Такие нарушения возникают у небольшого количества людей, примерно у 1 человека на 1 000 000. В настоящее время имеется чрезвычайно ограниченный спектр лекарств, предназначенный для лечения этих нозологий. Стоимость лечения пациентов такими лекарствами превышает 3 000 000 рублей в год (например лекарством Солирис-Экулизумаб). Высокая цена лечения вынуждает производить дальнейшую разработку более дешевых аналогов этих лекарств. Однако из-за малой распространенности этих заболеваний и из-за того, что большинство из пациентов дети, возникают сложности с масштабным испытанием таких лекарств. Это приводит к необходимости разработки веществ, которые будут приводить к «имитации» таких заболеваний в условиях *in vitro*. Эти вещества также необходимо тестировать в специальных тест-системах. В настоящее время все системы не подходят для выполнения этой задачи.

На основе существующих тест-систем предлагается тест-система, основанная эритроцитах человека и сыворотке человека. В ней эритроциты человека 2й, 3й или 4й группы крови опсонизируются с помощью гемагглютиногенов плазмы 1й группы крови. На поверхности эритроцитов 2й, 3й и 4ой групп крови присутствуют А- и В-

агглютиногены, поэтому добавление плазмы 1ой группы крови приводит к опсонизации эритроцитов альфа- и бета-агглютинами. Эти эритроциты выступают в роли мишеней. По выходу гемоглобина из них можно оценивать процент лизировавших клеток. Блокирование ингибиторов CD55 и CD59 на поверхности эритроцитов происходит с помощью антител BRIC 110, BRIC 216, BRIC 229.

Таким образом в тест-системе предварительно используются эритроциты человека, опсонизированные гемагглютинами и антителами BRIC 110, BRIC 216, BRIC 229. Сыворотка человека разводится в 10-20 раз. Новая тест-система позволила выявить вещества потенциально пригодные для «имитации» заболеваний *in vitro* и позволила выявить потенциальные ложные результаты (Рисунок 56).

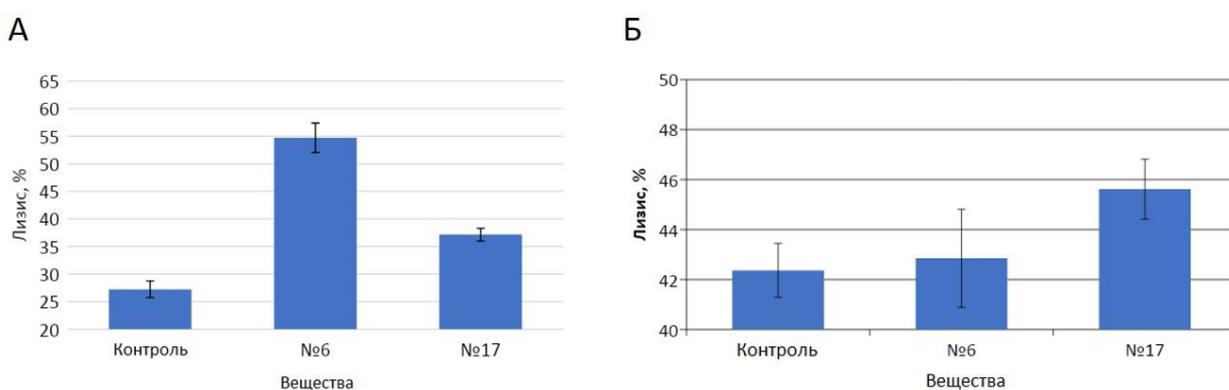


Рисунок 56 Скрининг различных ингибиторов системы комплемента для имитации нарушения функции комплемента с использованием конвенциональной тест-системы, основанной на лизисе эритроцитов барана системой комплемента человека (СН50).

Вещества №6 и №17 повышают активность системы комплемента, что приводит к увеличению лизиса эритроцитов барана. Это означает, что эти вещества могут «имитировать» нарушение в функции комплемента и вызывающую его гиперактивацию (что у человека вызывает развитие аГУС и ПНГ) (А). Скрининг различных ингибиторов системы комплемента для имитации нарушения функции комплемента с использованием новой тест-системы, основанной на лизисе эритроцитов человека системой комплемента человека. Новая тест система показала, что только вещество №17 реально вызывает нарушение в работе комплемента человека, а результат для №6 является ложным. N=6 (Б).

Погрешности рассчитаны как стандартные отклонения.

## 2.2. Математическое моделирование клеточного метаболизма в клетках организма человека

### 2.2.1. Математическое моделирование клеточного метаболизма фолатов в гепатоцитах

Метаболизм фолатов в клетках млекопитающих важен для множества жизненно важных процессов, включая синтез пурина и пиримидина, катаболизм гистидина, рециркуляцию метионина и утилизацию муравьиной кислоты. Однако остается неизвестным, влияют ли эти процессы друг на друга через метаболизм фолатов или могут функционировать независимо, исходя из потребностей клетки. Мы исследовали этот вопрос, используя количественную математическую модель метаболизма фолатов в цитоплазме печени крысы. Изменения в скорости метаболических процессов, связанных с метаболизмом фолатов (т.е. синтез пурина и пиримидина, катаболизм гистидина и притоки формиата и метионина) в модели показали, что метаболизм фолатов организован так, что позволяет активировать или ингибировать каждый процесс индивидуально независимо от метаболических потоков в других. Эта независимость основана на высокой активности группы ферментов, участвующих в метаболизме фолатов, которые эффективно поддерживают близкие к равновесным соотношения между субстратами и продуктами своих ферментативных реакций.

Млекопитающие не могут синтезировать фолаты *de novo*, и поэтому должны получать их из пищи и кишечной бактериальной флоры. Чтобы стать метаболически активным, фолаты должны быть ковалентно связаны с глутаматом. Основной формой циркулирующего в крови фолата является моноглутамат 5-метилтетрагидрофолата, который активно транспортируется в клетки специфическими переносчиками (Рисунок 57). В цитоплазме фолаты превращаются в полиглутаматные формы, которые содержат пять или шесть глутаматных остатков на молекулу фолата, предотвращая их транспорт из клетки и значительно увеличивая их сродство к ферментам, связанным с фолатами. В физиологических условиях фолаты подвергаются медленному неферментативному окислению и деградации, что, вероятно, определяет скорость оттока фолиевой кислоты из клеток. Сумма внутриклеточных концентраций фолата образует внутриклеточный пул фолатов, доступный для множественных внутриклеточных метаболических процессов. Скорость каждого метаболического процесса, связанного с метаболизмом фолата, определяется клеточной потребностью в соответствующих метаболитах. Однако остается неизвестным, могут ли связанные биохимические процессы функционировать независимо или связаны друг с другом посредством метаболизма фолатов. В нашем исследовании мы решили этот вопрос, используя количественную математическую модель метаболизма фолатов.



На Рисунке 58 показаны области допустимых метаболических потоков для различных пар метаболических процессов, связанных с метаболизмом фолатов. Интересно, что для метаболической пары утилизация формиата - синтез пуринов активация одного процесса увеличивает максимальную активность для другого (Рисунок 58 Б). Это может быть объяснено тем фактом, что в процессе утилизации формиата образуется фолатный субстрат для синтеза пуринов (Рисунок 57). Аналогичный, но менее выраженный эффект наблюдается для пары катаболизма гистидина и синтеза пурина (Рисунок 58 В). Кроме того, увеличение притока метионина вызывает увеличение пределов активации для других метаболических процессов из-за повышения уровня их фолатных субстратов (10-ТНФ, СН<sub>2</sub>-ТНФ и ТНФ) (Рисунок 58 Г-Е),

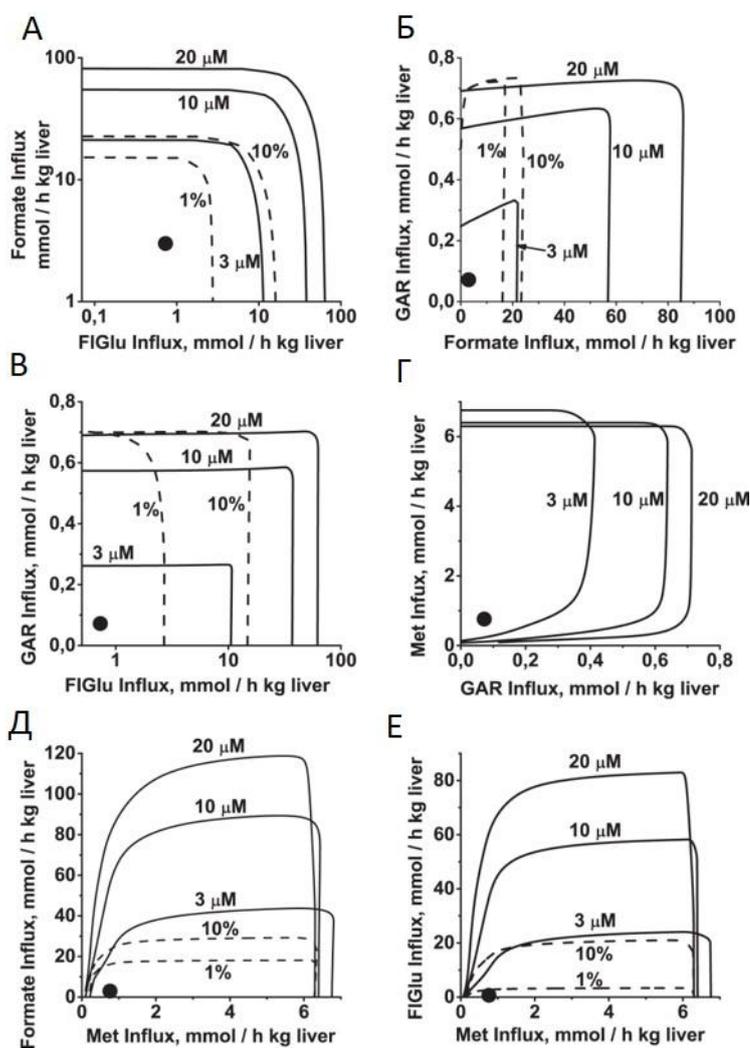


Рисунок 58. Независимое функционирование метаболических процессов, связанных с метаболизмом фолатов. Сплошные линии показывают максимально допустимые скорости метаболических процессов при различных размерах пула фолатов для следующих пар: (А) катаболизм гистидина и утилизация формиата; (Б) утилизация формиата и синтез пуринов; (В) катаболизм гистидина и синтез пуринов; (Г) синтез формиата и синтез пуринов; (Д) синтез формиата и синтез пуринов; (Е) синтез гистидина и синтез пуринов.

пуринов и метаболизм метионина; (Д) метаболизм метионина и утилизация формиата; (Е) метаболизм метионина и катаболизм гистидина. На каждой панели постоянные параметры устанавливались на нормальном физиологическом уровне. Размеры пула фолатов (в мкМ) указаны рядом с соответствующими сплошными линиями. Пунктирные линии показывают максимально допустимые скорости метаболических процессов, полученные при размере пула фолатов 20 мкМ и при сниженной активности SHMT, MTHFC и MTHFD до 10% и 1% от их начальных значений, как указано. Активность всех трех ферментов снижалась одновременно. На панели Г линии, полученные при 10% и 1% начальной ферментативной активности, совпадают с линиями, полученными при начальной ферментативной активности. Черный кружок обозначает нормальное физиологическое состояние.

Области допустимых метаболических потоков уменьшаются с уменьшением размера пула фолата, но независимость активации не исчезает.

Наши результаты показывают, что метаболизм фолата в печени крысы представляет собой типичный случай модульной организации клеточного метаболизма с несколькими отдельными метаболическими системами (метаболизм пуринов, метаболизм пиримидина, метаболизм метионина и т. д.), связанными через фолаты и функционирующими практически независимо друг от друга (Рисунок 59).

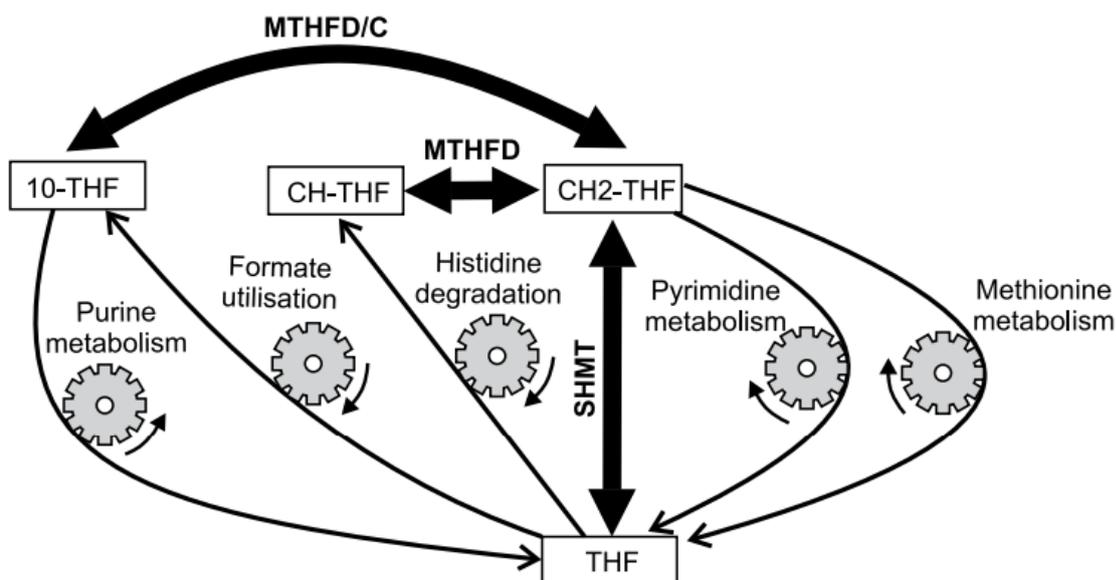


Рисунок 59. Механизм регуляции метаболизма фолиевой кислоты. Тонкие стрелки обозначают фолат-зависимые процессы, жирные стрелки - быстрые обратимые реакции метаболизма фолатов.

Интересно, что степень независимости между системами может быть разной в одной и той же топологии метаболической сети. Уменьшение величины пула фолатов, а также снижение активности ферментов SHMT, MTHFC и MTHFD вызывает значительное уменьшение области независимого функционирования метаболических систем, связанных с метаболизмом фолатов. Можно ожидать, что основным условием независимости ассоциированных процессов в метаболизме фолатов является высокая активность ферментов, перераспределяющих различные формы фолатов между ассоциированными процессами по сравнению с метаболическими потоками в ассоциированных процессах. Другими словами, характерные времена фолатов должны быть небольшими по сравнению с характерными временами метаболитов в связанных метаболических процессах.

## **2.3. Новые методы терапии социально-значимых заболеваний**

### **2.3.1. Фармакологическое подавление цитотоксического действия про-воспалительных цитокинов на островковые бета-клетки**

Патологические процессы, приводящие к развитию аутоиммунного диабета 1-го типа и, отчасти, инсулиннезависимого диабета 2-го типа, основаны на гибели производящих инсулин островковых бета-клеток под действием про-воспалительных цитокинов. По сравнению с большинством других клеток, панкреатические бета-клетки имеют повышенную чувствительность к про-воспалительным цитокинам. После соответствующей активации из кровеносных сосудов в панкреатические островки проникают клетки иммунной системы: Т-лимфоциты (CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>), дендритные клетки и моноциты. Их поражающее действие на бета-клетки обусловлено многими факторами, среди которых – активация рецепторов Fas при непосредственном контакте и выработка цитотоксических гранул (гранзимы) (регуляторные Т-клетки CD4<sup>+</sup>), секреция про-воспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ ) (макрофаги и цитотоксические Т-клетки CD8<sup>+</sup>). Источником цитокинов служат также и сами бета-клетки. Цитотоксический эффект IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  на бета-клетки в значительной степени связан с активацией в них транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B. Непосредственной причиной гибели этих клеток служит активация экспрессии индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и ряда других зависимых от NF- $\kappa$ B генов. Вместе с тем, NF- $\kappa$ B индуцирует экспрессию в бета-клетках экспрессию и последующую секрецию цитокинов

и хемокинов (IL-1, IL-8, MIP-1 $\alpha$ ), которые способствуют проникновению лимфоцитов и моноцитов из кровеносных сосудов в островки и их активации (Рисунок 60).

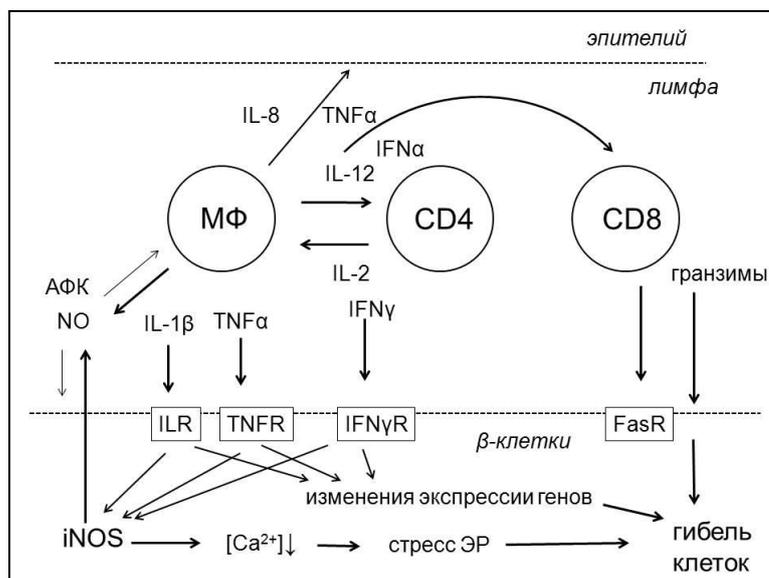


Рисунок 60. Обобщенная схема аутоиммунного процесса при диабете 1 типа.

После первичной активации, в которой участвуют дендритные клетки (не показаны), цитотоксические лимфоциты через эндотелий кровеносных сосудов проникают в заполненное лимфой пространство островков поджелудочной железы. Там лимфоциты вступают в сложное взаимодействие между собой и секретирующими инсулин бета-клетками. В сигнальных процессах участвуют цитокины, хемокины (IL-8), активные формы кислорода (АФК) и азота (АФА). Во многом эти процессы организованы по принципу положительной обратной связи. Про-воспалительные цитокины и окислительный стресс усиливают миграцию и созревание лимфоцитов, стимулируют дальнейшую генерацию цитокинов, хемокинов, АФА и АФК, а также инициируют адгезию между цитотоксическими Т-лимфоцитами CD8<sup>+</sup> и бета-клетками. При действии про-воспалительных цитокинов на макрофаги (МФ) и бета-клетки в них происходит индукция iNOS и рост выработки NO. Действуя на лимфоциты NO усиливает секрецию ими про-воспалительных цитокинов, действуя на бета-клетки – способствует снижению уровня ионов Ca<sup>2+</sup> в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), что вызывает стресс ЭР и индуцирует апоптоз. Гибель бета-клеток также обусловлена зависимыми от цитокинов изменениями экспрессии генов, прежде всего теми, которые контролирует фактор NF-κB. Большое значение также имеет активация цитотоксических Т-лимфоцитов CD8<sup>+</sup> и секреция ими токсических гранзимов. При прямом контакте Т-лимфоцитов CD8<sup>+</sup> и бета-

клеток гибель последних может быть обусловлена активацией рецепторов Fas (FasR). ILR, TNFR, IFN $\gamma$ R – рецепторы цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ , соответственно.

Проводимые нами исследования направлены на поиск путей воздействия на сигнальные системы бета-клеток, способные подавлять активацию NF- $\kappa$ B и цитотоксические эффекты цитокинов. Известно, что транскрипционные факторы Nrf2, HIF-1 $\alpha$  и KLF2 действуют как антагонисты NF- $\kappa$ B, с которым они конкурируют за связывание с ко-активаторными белками CBP/p300. Активация транскрипционных факторов Nrf2, HIF-1 $\alpha$  и KLF2 подавляет экспрессию контролируемых NF- $\kappa$ B генов. Кроме того, регуляция экспрессии ряда NF- $\kappa$ B-зависимых генов, таких как iNOS и циклооксигеназа 2 (COX2), происходит не только на уровне транскрипции, но и трансляции и зависит от фактора инициации трансляции eIF5A (Рисунок 61). Активность eIF5A критически зависит от уникальной ковалентной модификации - гипузинирования, представляющей собой перенос аминобутильного остатка на специфический остаток лизина eIF5A (Lys50 у человека) с образованием остатка гипузина. Вопреки традиционному названию, eIF5A участвует не только в процессе инициации, но и элонгации полипептидных цепей. При этом eIF5A необходим для трансляции относительно небольшой части (примерно 5%) спектра внутриклеточных мРНК. Принято считать, что мРНК, для трансляции которых необходим eIF5A, в значительной степени представляют собой транскрипты генов, относящихся к функциональным группам участвующим в пролиферации и воспалительных процессах

#### Фармакологические воздействия на сигнальные системы подавляющие NF- $\kappa$ B

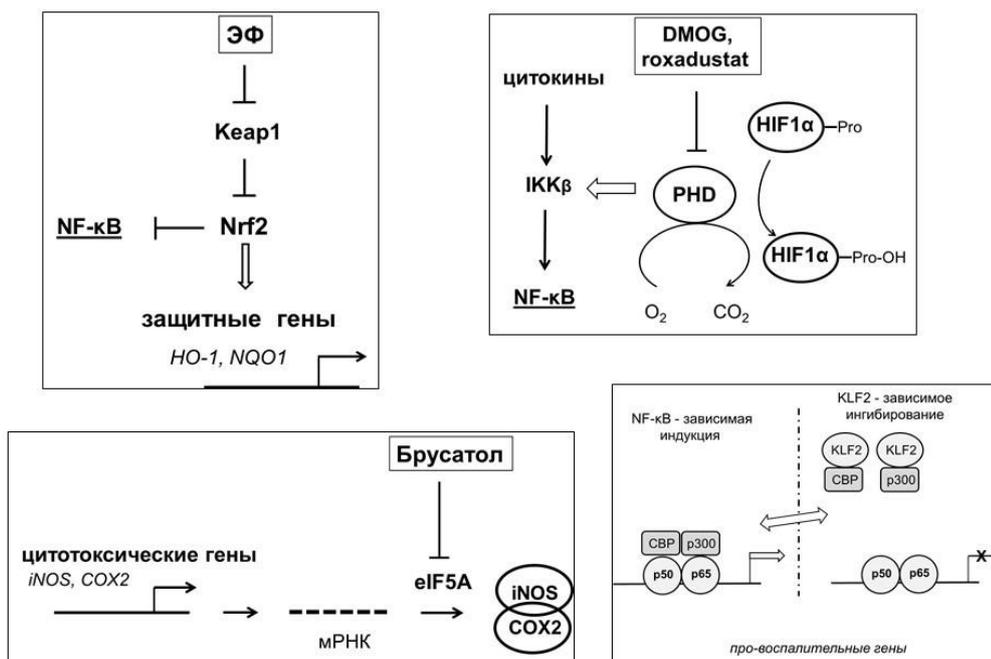


Рисунок 61. Сигнальные системы, подавляющие ответ клеток на активацию NF-κB.

Фактор eIF5A подавляет трансляцию мРНК зависимых от NF-κB генов синтазы оксида азота iNOS и циклооксигеназы COX2. Фактор NF-κB состоит из субъединиц p50 и p65. Системы Keap1/Nrf2, KLF2 и PHD/HIF-1α подавляют транскрипцию зависимых от NF-κB про-воспалительных генов. Действие Nrf2 и KLF2 основано на конкуренции за связывание с ацетилтрансферазами CBP/p300, действие PHD – на фосфорилировании и ингибировании протеинкиназы IKKβ. Сокращения: ЭФ – электрофилы; PHD – пролилгидроксилазы; HO-1 - гемоксигеназа 1; NQO1 - NAD(P)H хиноноксидоредуктаза 1.

По нашим данным брусатол, дитерпеноид растительного происхождения, действует как избирательный ингибитор eIF5A. Ингибирующее действие брусатола основано на подавлении модификации eIF5A гипузином. Под действием брусатола происходит подавление четырех напрямую не связанных между собой ответных реакций бета-клеток на действие про-воспалительных цитокинов: гибели клеток, окислительного стресса, активации экспрессии iNOS и нарушения секреции инсулина (Рисунок 62).

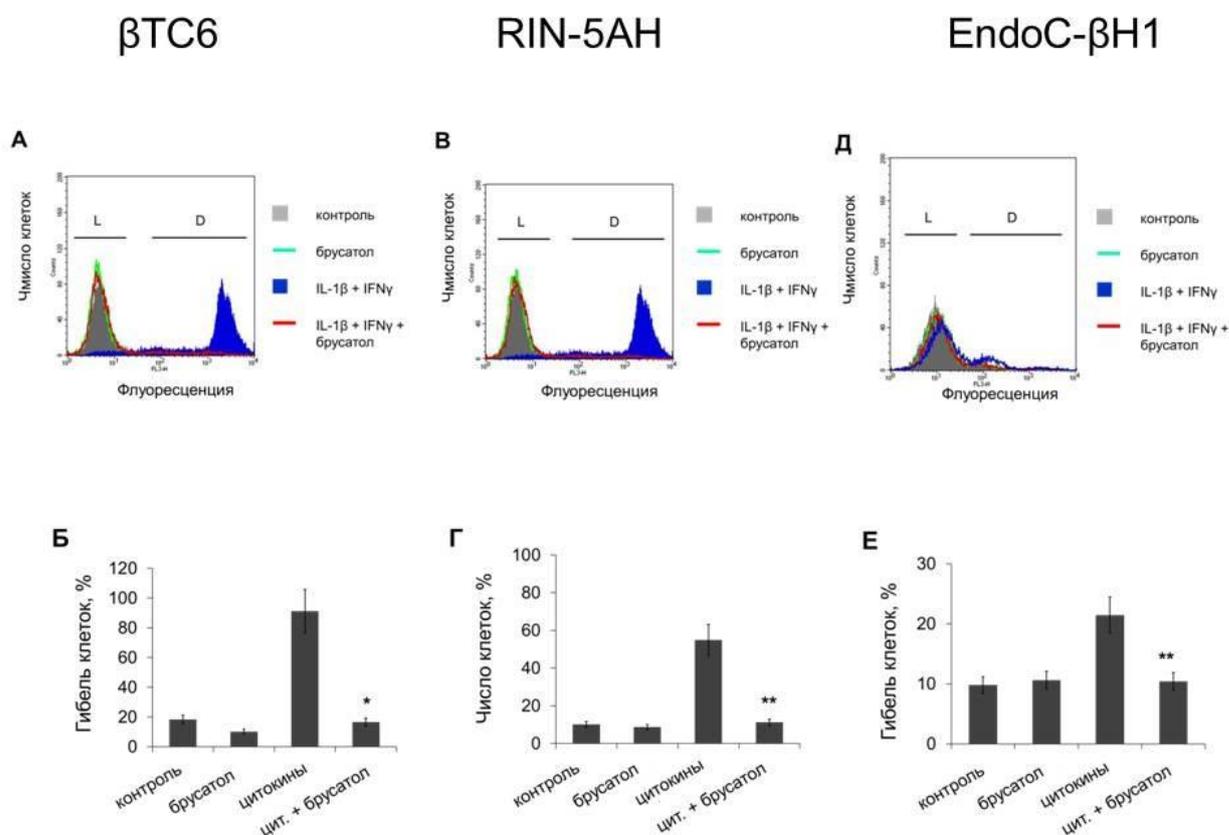


Рисунок 62. Брусатол повышает устойчивость бета-клеток к про-воспалительным цитокинам.

Клетки  $\beta$ TC6 (А, Б), RIN-5АН (В, Г) и EndoC- $\beta$ H1 (Д, Е) обрабатывали брусатолом (50 нМ, 30 мин) перед совместной инкубацией с IL-1 $\beta$  и IFN $\gamma$  (10 нг/мл каждый) в течение 24 ч. Клетки метили иодистым пропидием и анализировали при помощи проточной цитометрии. (А, В, Д) Гистограммы распределения живых и пораженных клеток. Флуоресцентные сигналы живых и мертвых клеток, обозначенные, соответственно, как L и D. (Б, Г, Е).

Мы также обнаружили, что брусатол стимулирует гликолитический путь метаболизма глюкозы, что проявляется в увеличении выработки лактата. На физиологическом уровне брусатол повышает чувствительность тканей к инсулину и снижает уровень глюкозы в крови животных, находящихся на обогащенной жирными кислотами диете (Рисунок 63). Тем самым, брусатол и, возможно, близкие по структуре соединения представляют интерес как фармакологические препараты, способные противодействовать связанным с диабетом патологическим процессам.

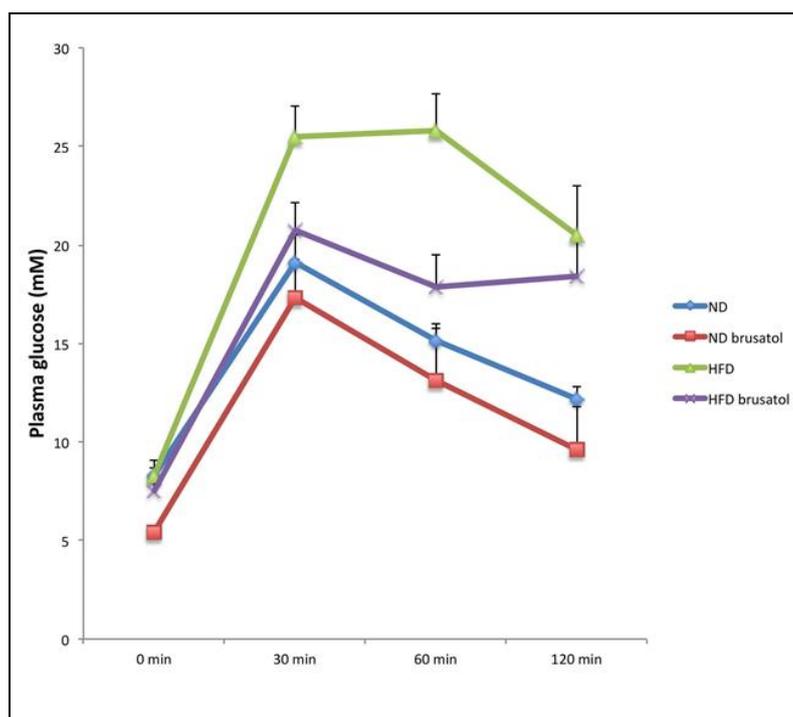


Рисунок 63. Толерантность к глюкозе у мышей, находящихся на нормальной (ND) и обогащенной жирными кислотами (HFD) диетах.

Мыши находились на нормальной диете (ND, 10% ккал жира) или обогащенной жиром диете (HFD, 60% ккал жира) в течение 13 недель. Затем в каждой группе половина животных получала в питьевой воде брусатол (1 мкг/день/г веса). Через две недели воздействия брусатолом мышам после 6-часового голодания впрыскивали глюкозу (2,5

г/кг). Содержание глюкозы в крови измеряли в указанное на графике время. Приведено стандартное отклонение (n=32).

Также подавление активности NF-κB, индукции iNOS и других провоспалительных генов происходит при фармакологической активации транскрипционного фактора Nrf2. Активация Nrf2 происходит при действии на клетки широкого спектра экзогенных и эндогенных электрофильных соединений, которые инактивируют ингибирующий Nrf2 редокс-чувствительный белковый фактор Keap1. Для активации Nrf2 мы применяли серию синтетических бензилиденмалонитрилов. На активность NF-κB также влияют пролилгидроксилазы PHD (1-3). Основная функция этих ферментов – инактивация фактора гипоксии HIF-1α. Вместе с тем, по нашим данным фармакологические ингибиторы пролилгидроксилаз (DMOG, роксадустат и др.) активируют HIF-1α и предотвращают гибель бета-клеток под действием провоспалительных цитокинов. В деталях механизм действия пролилгидроксилаз на NF-κB неясен.

### **2.3.2. Разработка метода патогенетической терапии моторных (брадикинизия, ригидность, тремор) и немоторных (депрессия) нарушений при болезни Паркинсона**

В последние десятилетия болезнь Паркинсона являлась объектом многочисленных исследований, однако до настоящего времени патогенез этого заболевания не ясен и не разработаны эффективные методы антипаркинсонической терапии.

Эпидемиологические исследования выявили высокую частоту депрессивных расстройств у паркинсонических больных; эти расстройства, как установлено, могут развиваться задолго до паркинсонизма. Все это позволяет предположить наличие общих звеньев в патогенезе паркинсонизма и депрессии. Для исследования этого вопроса были проведены описанные ниже эксперименты.

*Влияние клинически эффективных антидепрессантов на нейрональную активность различных ядер мозга крыс.*

Было исследовано влияние клинически эффективных антидепрессантов, относящихся к различным химическим классам, на нейрональную активность различных ядер мозга крыс. Животные подвергались хроническому 21-дневному воздействию имипрамином (ингибитор обратного захвата норадреналина и серотонина), ребоксетином (ингибитор обратного захвата норадреналина), флюоксетином (ингибитор обратного

захвата серотонина), бупропионом (ингибитор обратного захвата норадреналина и дофамина), миртазапином (антагонист центральных пресинаптических  $\alpha_2$  адренорецепторов), агомелатином (агонист мелатониновых MT1 и MT2 рецепторов) и фенельзином (ингибитор моноаминоксидазы).

В предварительных экспериментах было установлено, что в использованных дозах препараты эффективно влияют на функционирование мозга крыс, изменяя поведение животных в тесте форсированного плавания (Рисунок 63).

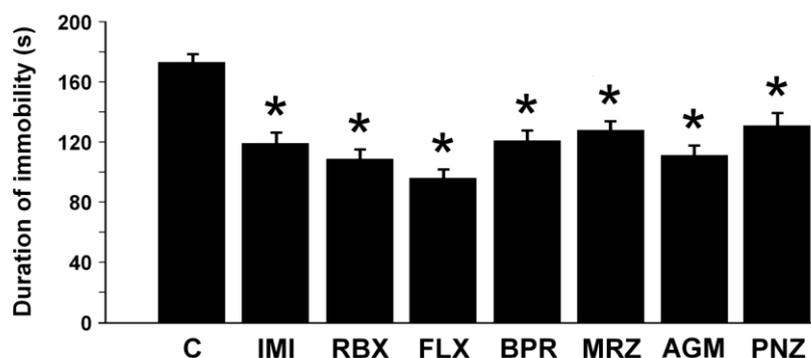


Рисунок 63. Влияние антидепрессантов на поведение животных в тесте форсированного плавания (mean  $\pm$  SEM; n = 8).

C – контроль (растворитель); IMI – имипрамин; RBX – ребоксетин; FLX – флюоксетин; BPR – бупропион; MRZ – миртазапин, AGM – агомелатин, PNZ – фенельзин.

\*  $p < 0.01$ , статистически значимое отличие от контроля.

В использованных дозах все антидепрессанты статистически достоверно повышали нейрональную активность в латеральной энторинальной коре (Рисунок 64).

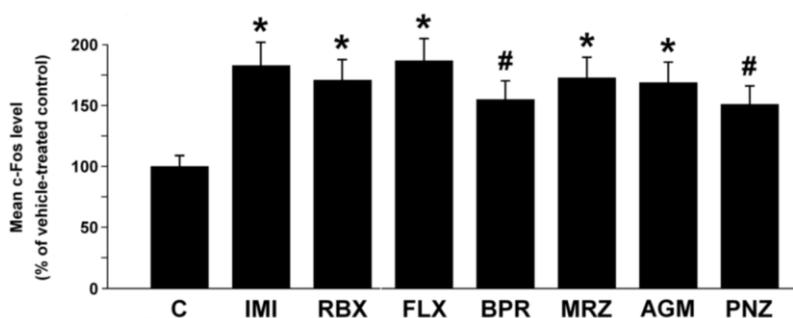


Рисунок 64. Влияние антидепрессантов на c-Fos экспрессию в латеральной энторинальной коре

Результаты представлены в виде mean  $\pm$  SEM; n = 8.

C – контроль (растворитель); IMI – имипрамин; RBX – ребоксетин; FLX – флюоксетин; BPR – бупропион; MRZ – миртазапин, AGM – агомелатин, PNZ – фенельзин.

#  $p < 0.05$ , \*  $p < 0.01$ , статистически значимое отличие от контроля.

Учитывая, что развитие каталепсии у крыс связано с гипоактивацией латеральной энторинальной коры, указанное мозговое ядро может являться общей мишенью для каталептогенов и антидепрессантов. В совокупности, эти результаты обосновывают предположение, что гипоактивация латеральной энторинальной коры является общим патогенетическим звеном в развитии паркинсонизма и депрессии.

В свете этого предположения использование антидепрессантов может стать эффективным способом лечения паркинсонизма.

На следующем этапе работы была исследована возможность использования агентов с антидепрессивным действием для предотвращения паркинсонических нарушений.

*Влияние комбинации «имипрамин-никотин» на интенсивность ротенон-индуцированной каталепсии у крыс.*

Для оценки антипаркинсонического действия препаратов использовали каталепсию – поведенческую реакцию у грызунов, напоминающую брадикинезию и ригидность при паркинсонизме. Каталепсия была индуцирована нейротоксином ротеноном.

Установлено, что комбинация «имипрамин-никотин» существенно тормозила развитие каталепсии; эффект этой комбинации превышал таковой стандартного антипаркинсонического препарата, представляющего собой комбинацию леводопы и бенсеразида (Рисунок 65).

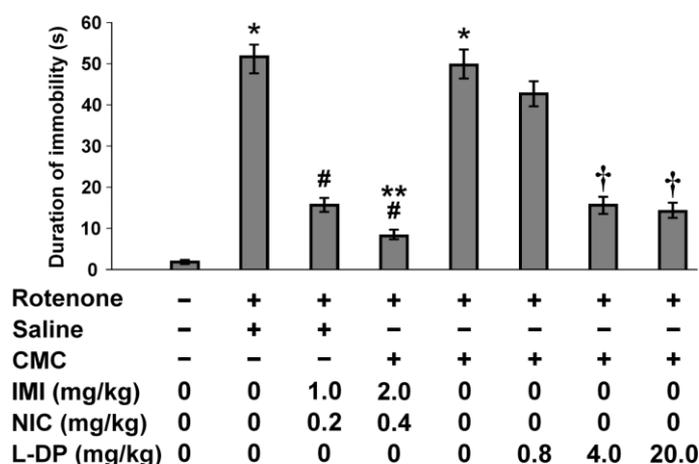


Рисунок 65. Сравнение антикаталептической активности комбинаций «имипрамин-никотин» и «леводопа- бенсеразид».

Результаты представлены в виде medians  $\pm$  interquartile ranges;  $n = 8$ .

\*  $p < 0.01$ , достоверное отличие от интактных животных.

#  $p < 0.01$ , достоверное отличие от животных, получавших ротенон.

†  $p < 0.01$ , достоверное отличие от животных, получавших ротенон+ СМС.

\*\*  $p < 0.01$ , достоверное отличие от животных, получавших комбинацию  
«леводопа-бенсеразид».

IMI – имипрамин, NIC – никотин, L-DP – комбинация леводопы и бенсеразид;  
СМС – карбоксиметилцеллюлоза (растворитель).

*Влияние комбинации «мемантин-каннабинол» на интенсивность паркинсоноподобного тремора у крыс.*

В этих экспериментах в качестве модели паркинсоноподобного тремора использовали вызванные галоперидолом периодические сокращения жевательных мышц крысы.

Результаты, представленные на Рисунке 66, свидетельствуют о выраженном антитрemorном действии комбинации «мемантин-каннабинол»

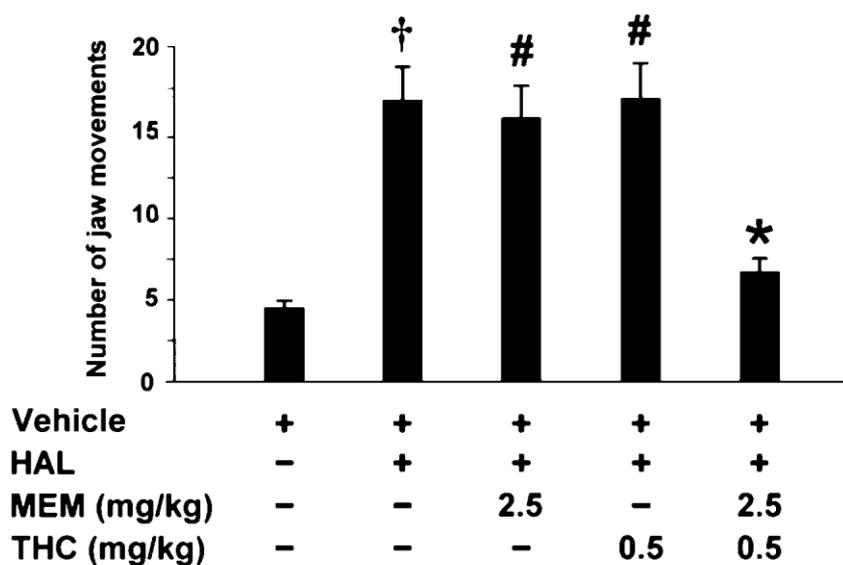


Рисунок 66. Трemorолитическое действие комбинации «мемантин-каннабинол».

Результаты представлены в виде  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ;  $n = 8$ .

† \*  $p < 0.01$ , достоверное отличие от животных, получавших растворитель.

# отсутствие отличий от животных, получавших галоперидол.

\*  $p < 0.01$ , достоверное отличие от животных, получавших галоперидол.

HAL – галоперидол; MEM – мемантин; THC – каннабинол.

Проведенное исследование свидетельствует о том, что комбинации имипрамина с никотином и мемантина с каннабинолом являются эффективными средствами торможения экспериментальных паркинсоноподобных нарушений. Очевидно, целесообразно дальнейшее изучение этих комбинаций в качестве потенциальных средств лечения болезни Паркинсона.

## **2.4. Дерматология**

### **2.4.1. Поиск и изучение молекулярно-генетических маркеров ассоциированных с дерматологическими и психическими заболеваниями**

Нами были отобраны пациенты (n=88) с диагнозом псориаз, проживающие в Москве и Московской области, были отобраны в соответствии с 10-й редакцией Международной классификации болезней (L-40). Образцы крови пациентов были получены в больнице №14 им. В.Г. Короленко. В качестве контроля использованы образцы ДНК, выделенные из цельной крови необследованных жителей Москвы и Московской области (популяционный контроль; n=365). Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Все пациенты были проинформированы о целях исследования и возможности публикации его результатов. Генотипы исследованных замен определяли с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) с использованием коммерческого набора реагентов для проведения ПЦР HS Taq ДНК полимеразы (ЗАО «Евроген», Москва). Праймеры были синтезированы в ООО «ДНК-Синтез» (Москва), последовательности представлены в Таблице 2.

Реакцию ПЦР проводили в амплификаторе T100 (Bio-Rad, USA) по следующей схеме: 95°C, 3 мин, 35 циклов (94°C, 20 с / температура в Таблице 2, 15 с / 72°C, 30 с), 72°C, 3 мин. Замена rs141116007 тестировалась на наличие/отсутствие вставки в 19 п.н. (120 или 101 п.н., соответственно). Рестрикцию продуктов ПЦР проводили с использованием ферментов НПО «СибЭнзим» (Новосибирск), для замены rs1611115 – FauI (CC=89+77; CT=166+89+77; TT=166), для замены rs2097629 – BstMAI (GG=179+50; GA=179+132+50+47; AA=132+50+47), со гласно инструкциям производителя. Продукты реакций разделяли в 2% агарозном геле.

Таблица 2. Последовательности пар праймеров к исследованным в работе заменам, температура отжига.

Замена	Последовательность праймеров	T <sub>отж</sub> , °C
rs141116007	F: GGCTTGGTGTGGTTAGGATGA R: CCAGGGTCTTGTGCCTCACA	59
rs2097629	F: GGCTTGGTGTGGTTAGGATGA R: CCAGGGTCTTGTGCCTCACA	61
rs1611115	F: CTAGTCCAGCTGGAGAGATCT R: TTTGCCATCATCCACCCGTG	61

Статистическую обработку проводили с применением программы WinPeri, поиск комплексных генотипов – с использованием программы APSampler. Достоверными считали результаты при вероятности ошибки  $p < 0,05$ . Выбор моделей наследования (доминантная или рецессивная) производился в соответствии с критерием Акаике (AIC).

В ходе проведенных исследований выявлена частота аллелей исследованных замен и оценена их связь с заболеванием (Таблица 3).

Таблица 3. Частоты аллелей исследованных замен в выборке пациентов и контрольной выборке и результаты статистической обработки.

Замены	Аллели	Пациенты	Контроль	Фи(p)	ОШ	ДИ95%
rs141116007	I	0,540	0,577	0.395	0.86	0.61-1.21
	D	0,460	0,423		1.17	0.82-1.65
rs2097629	C	0,394	0,395	1.000	0.99	0.69-1.42
	T	0,606	0,605		1.01	0.71-1.44
rs1611115	C	0,614	0,745	0.001	0.55	0.38-0.79
	T	0,386	0,255		1.83	1.26-2.64

Фи(p) – двусторонний критерий Фишера (значение p-value), ОШ – отношение шансов; ДИ95% – 95% доверительный интервал.

Выявлена ассоциация аллеля Т замены rs1611115 с псориазом. Также проанализированы связи генотипов исследованных замен с псориазом и выявление модели наследования для замен (Таблица 4).

Таблица 4. Анализ генотипов исследуемых замен и модели наследования.

Замены	Сочетания генотипов	Пациенты	Контроль	Фи(p)	ОШ	ДИ95%	МОД

rs14111600 7	II	0,273	0,361	0.133	0.67	0.38-1.14	дом.
	ID+DD	0,727	0,639		1.50	0.88-2.64	
rs2097629	TT	0,176	0,157	0.626	1.15	0.57-2.21	дом.
	CC+CT	0,824	0,843		0.87	0.45-1.75	
rs1611115	TT	0,289	0,092	1.1E- 5	4.02	2.11-7.53	рец.
	CC+CT	0,711	0,908		0.25	0.13-0.47	

Фи(p) – двусторонний критерий Фишера (значение p-value), ОШ – отношение шансов; ДИ95% – 95% доверительный интервал; МОД – модели наследования: дом. – доминантная модель наследования; рец. – рецессивная модель наследования.

Анализ сочетаний генотипов выявил ассоциацию с псориазом генотипа TT замены rs1611115 – данный генотип чаще встречается у пациентов в  $\geq 3$  раза. Аллель Т данной замены имеет рецессивную модель наследования – наличие аллеля С снижает вероятность развития псориаза в 4 раза.

Поиск связанных с псориазом комплексных генотипов исследуемых замен также выявил ассоциацию генотипа TT замены rs1611115: критерий Фишера  $p=1,37e-05$ , ОШ – 3,87637, 95% ДИ – 2,15–7,00, коррекция Bonferroni  $p=0,0006$ ,  $p<0,001$  после 1000 пермутаций. Других генотипов, статистически значимо ассоциированных с псориазом, не выявлено.

Белок DBH локализуется в цитоплазме и секреторных везикулах норадренергических и адренергических нейронов. DBH также поступает в плазму после везикулярного высвобождения из симпатических нейронов и мозгового вещества надпочечников. Активность DBH в плазме широко варьирует среди индивидов, в основе этого лежит полиморфизм гена.

DBH является медьсодержащим ферментом и катализирует превращение дофамина в норэпинефрин (норадреналин), кофакторы реакции – аскорбиновая кислота и кислород. Ранее связь полиморфизма гена DBH с псориазом не рассматривалась.

Исследуемые замены в гене DBH (кроме rs2097629, NM\_000787.3:c.1434+1579A>G) связаны с изменением функциональной активности гена DBH. Замена rs141116007 (NG\_008645.1:g.249\_267del19) ассоциирована со средним уровнем активности DBH в плазме – гомозиготы del/del и ins/ins ассоциированы соответственно с низким и высоким уровнем активности DBH в плазме [8]. Замена rs1611115 (NM\_000787.3:c.-979T>C) – аллель Т снижает транскрипционную активность

гена и уровень DBH в плазме. У гомозиготных носителей по аллелю Т самая низкая активность DBH в плазме.

Полученные нами данные свидетельствуют о достоверной ассоциации генотипа ТТ замены rs1611115 с псориазом. Данный аллель ассоциирован со снижением транскрипционной активности гена DBH и уменьшением его количества в плазме. Замены rs141116007 и rs2097629 не связаны с псориазом. Таким образом, снижение активности DBH, увеличение количества дофамина и снижение норадреналина может быть связано с псориазом. Мы можем предположить, что изменение концентрации данных нейромедиаторов играет роль в развитии псориаза.

По результатам изложенного сделаны следующие выводы:

- генотип ТТ замены rs1611115 в гене DBH значимо ассоциирован с псориазом ( $p < 0,001$ ; ОШ – 3,88), при этом аллель Т наследуется рецессивно.
- аллель С замены rs1611115 наследуется доминантно и в 4 раза снижает вероятность развития псориаза.
- замены rs141116007 и rs2097629 в гене DBH не связаны с псориазом.

Чрезмерное накопление компонентов внеклеточного матрикса, особенно коллагена I и III типов, является основным патогенным событием в развитии склеродермии. Гомеостаз соединительной ткани – это баланс между синтезом и деградацией внеклеточного матрикса; деградация внеклеточного матрикса регулируется в основном матричными металлопротеиназами (ММП). ММП – это цинк-зависимые эндопептидазы, которые являются основными ферментами, ответственными за деградацию компонентов внеклеточного матрикса.

ММП-1 деградирует внеклеточные волокна, состоящие из коллагена I, II, III, VII, VIII, X и XI типов, фибронектина, ламинина, тенасцина и витронектина. ММП синтезируются и секретируются из клеток во внеклеточное пространство как проферменты и превращаются в активные формы вследствие ограниченного переваривания протеазами, включая плазмин. Активность ММП может ингибироваться тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (ТИМП), которые связываются с активированными ММП с молярной стехиометрией 1:1. Предполагается, что ММП-1 ингибируется специфичными антителами и тем самым участвует в развитии фиброза в склеродермии. Снижение деградации коллагена из-за недостаточности ММП может сыграть важную роль в развитии склеродермии. Однако насколько значительно снижается активность гена ММП-1 в коже больных с диагнозом локализованной склеродермии, в настоящее время не уточнено.

Биопсию осуществляли у 12 пациентов, находившихся на лечении в клинике им. В.Г. Короленко Московского научно-практического центра дерматовенерологии и косметологии с установленным диагнозом локализованной склеродермии. Пациенты были в возрасте от 25 лет до 71 года. Диагноз «локализованная склеродермия» в каждом случае устанавливали клинически и подтверждали при патоморфологическом изучении биоптатов кожи. Согласно клинической классификации Tuffanelli и Winkelmann, у 7 обследованных наблюдалась ограниченная бляшечная склеродермия (пациенты 1, 3–6, 8, 10) и у 5 – распространенная бляшечная форма (пациенты 2, 7, 9, 11 и 12). Диагностическими критериями распространенной формы были >4 бляшек диаметром >3 см в 1 анатомической области и(или) вовлечение  $\geq 2$  анатомических областей (пациент 9). Диаметр очагов варьировал от 2 до 40 см, занимая обширные участки тела (Таблица 5).

Таблица 5. Клинические показатели больных склеродермией

№ пациента	Пол	Возраст	Количество очагов	Форма (тяжесть)	Локализация	состояние бляшки	размеры очагов
1	м	47	1	ограниченная бляшечная	кожа спины	склероз	2 см
2	ж	52	4	распространенная бляшечная	Кожа живота	Эритематозный очаг, локальный отек	10
3	м	51	1	ограниченная бляшечная	живот, поясница, половой член	Эритематозные очаги, локальный отек	15 см, 5 см, 1 см
4	ж	63	3	ограниченная бляшечная	живот	Эритематозные очаги, локальный отек	3 см
5	м	28	1	ограниченная бляшечная	кожа спины	склероз	2 см
6	ж	26	3	ограниченная бляшечная	Кожа живота	Эритематозные очаги, локальный отек	3 см
7	ж	61	1	распространенная бляшечная	Кожа живота	Эритематозные очаги, локальный отек	>30 см
8	ж	59	2	ограниченная бляшечная	Кожа живота	Эритематозные очаги, локальный	5 см

						отек	
9	ж	67	>4	распространенная бляшечная	Кожа живота, верхних конечностей	Эритематозные очаги, локальный отек, склероз, индурация	>30см
10	м	68	4	ограниченная бляшечная	Кожа паха, ягодиц, бедер	индурация	5 см
11	ж	65	>4	распространенная бляшечная	Кожа живота	Эритематозные очаги, локальный отек	>30см
12	ж	57	>4	распространенная бляшечная	Кожа живота	Эритематозные очаги, локальный отек	20 см

Биоптаты из пораженного и непораженного участков кожи больных брали под местной анестезией с помощью дерматологического пробойника (4 мм). Биопсию из непораженных участков кожи осуществляли на расстоянии  $\approx 3$  см от пораженной кожи. Исследование одобрено Локальным комитетом по этике при Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН и соответствует принципам, изложенным в Декларации Хельсинкского соглашения.

Выделение РНК из биоптатов проводили на колонках Qiagen по стандартному протоколу RNeasy Mini Kit <sup>®</sup> для кожи. Для освобождения препаратов РНК от примесей ДНК проводили обработку ДНКазой Qiagen. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США) после чего образцы выравняли по концентрации в ddH<sub>2</sub>O.

Обратную транскрипцию проводили следующим образом: в пробирки для ПЦР объемом 200 мкл вносили буфер, dNTP, 100 ед. обратной транскриптазы M<sub>-</sub>MLV (Promega), 20 ед. ингибитора РНК-аз RNasin (Promega), 500 нг oligo(dT) праймеров («ДНК-Синтез») и РНК до конечной концентрации  $\leq 100$  нг/мкл. Смесь термостатировали 1 ч при 37°C. ПЦР-РВ проводили в 96-луночных оптических плашках с использованием меченных флуоресцентными агентами олигонуклеотидных проб. Реакцию проводили с использованием 5-кратной реакционной смеси с референсным красителем ROX qPCRmix-NS ROX (Евроген, Россия). Праймеры и пробы были синтезированы фирмой «ДНК-Синтез» (Таблица 6).

Таблица 6. Последовательности праймеров и проб, используемые для определения уровня экспрессии соответствующих им генов при помощи ПЦР-РВ

Гены	Последовательность 5' - 3'
GAPDH	Набор праймеров и проба компании «ДНК-синтез»
MMP-1	FAM-AATGTGCTACACGGATACCCCAAGGACA-BHQ1 CGGTTTTTCAAAGGGAATAAGTACT TCAGAAAGAGCAGCATCGATATG

Аmplификацию проводили в ПЦР-амплификаторе (Bio-Rad, iQ4), используя следующую программу: 1) денатурация при 95°C в течение 4 мин; 2) денатурация при 94°C в течение 15 с; 3) отжиг при 55°C в течение 15 с; 4) элонгация при 72°C в течение 15 с; 5) этапы 2–4 повторяли 50 раз. Экспрессию генов-мишеней нормализовали на ген домашнего хозяйства GAPDH.

Аmplификация гена GAPDH и исследуемых генов проводилась в разных пробирках. Для обсчета результатов использовали данные реакции ПЦР-РВ со следующими параметрами: эффективность праймеров в реакции ПЦР-РВ  $\geq 95\%$ ; коэффициент корреляции  $\geq 0,99$ ; наклон кривой (slope)  $-3,4 \pm 0,2$ .

Результаты ПЦР обрабатывали методом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , который показывает, во сколько раз изменяется экспрессия гена в пораженном образце по сравнению с непораженным.  $\Delta\Delta Ct$  рассчитывали как  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (пораженной кожи) –  $\Delta Ct$  (непораженной кожи) и каждое значение  $\Delta Ct = Ct$  (исследуемый ген) –  $Ct$  (GAPDH). Эксперименты проводили в 3-кратной повторности для каждого образца.

Большой интерес для нас представляло сравнение уровней экспрессии генов в пораженной части кожи больных склеродермией по отношению к визуально непораженной части кожи, находящейся на расстоянии  $\leq 3$  см от пораженной кожи одного и того же больного. Такое сравнение, принятое в ряде зарубежных лабораторий, позволяет максимально исключить влияние побочных факторов на чистоту эксперимента.

Проанализировав ряд статей и баз данных, мы пришли к выводу, что в исследованных процессах, играющих важную роль в развитии склеродермии, в качестве основных факторов присутствуют матриксные металлопротеиназы. Деградация внеклеточного матрикса регулируется в основном матриксными металлопротеиназами и, следовательно, напрямую зависит от активности генов металлопротеиназ.

Наибольшей коллагенолитической активностью обладает коллагеназа-1 (ММР-1). ММР-1 обнаружена при ремоделировании тканей в физиологических процессах и при различной патологии.

Таким образом, изучение активности гена ММР-1 представляется важным для изучения склеродермии. При индивидуальном анализе данных каждого больного показано, что уровень экспрессии гена ММР-1 в пораженной склеродермией коже понижен по сравнению с визуально непораженной кожей (контроль) в пределах от 4,2 (больной 6) до 20,8 раза (больной 7). Среднее значение изменения уровня экспрессии гена оказалось пониженным в  $7,6 \pm 2,6$  раза (Рисунок 67).

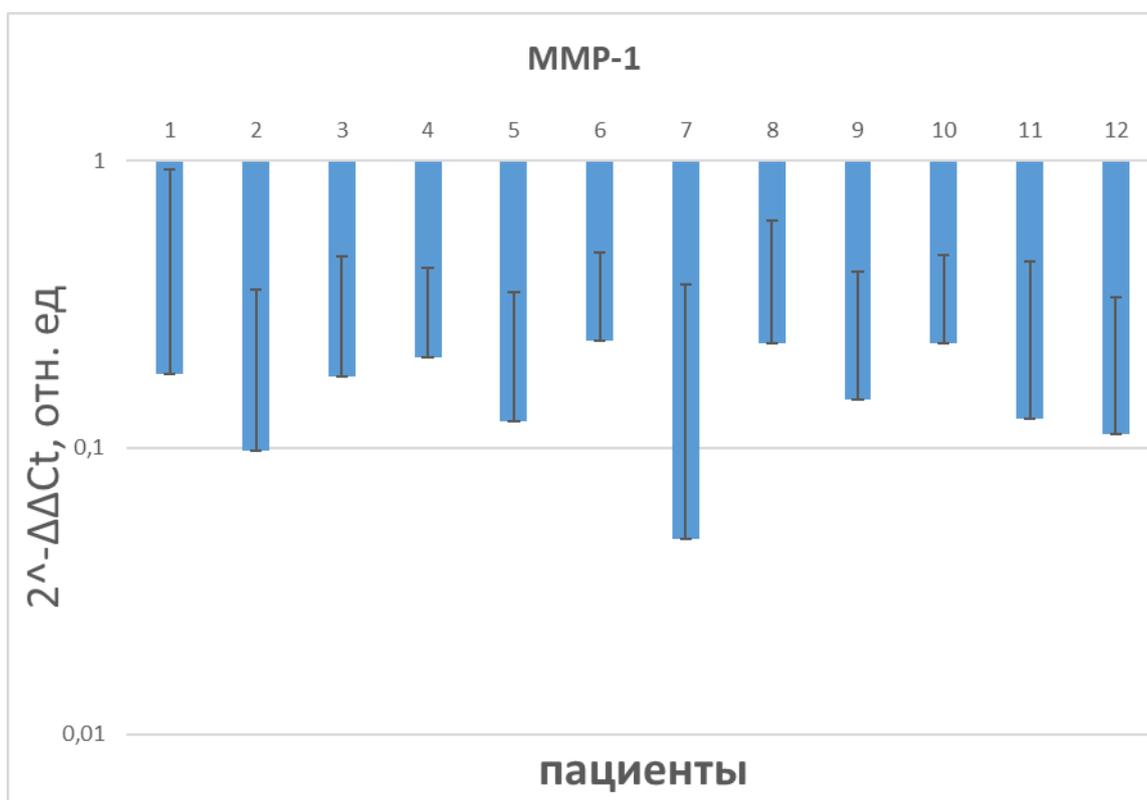


Рисунок 67. Уровень экспрессии мРНК гена ММР-1 в пораженной коже пациентов по отношению к уровню содержания в визуально непораженной склеродермией коже, принятому за 1.

У пациентов 2, 7, 9, 11 и 12 в пораженной коже наблюдалось самое значительное снижение экспрессии по сравнению с непораженной кожей. Примечательно, что у всех этих больных была распространенная бляшечная форма заболевания с бляшками диаметром >3 см в количестве >4 на одну анатомическую область. Разделив пациентов на 2 группы – с ограниченной (n=7: пациенты 1, 3–6, 8, 10) и распространенной (n=5,

пациенты 2, 7, 9, 11 и 12) бляшечными формами и обобщив экспрессионные данные в каждой группе, мы получили довольно интересный результат (Рисунок 68).

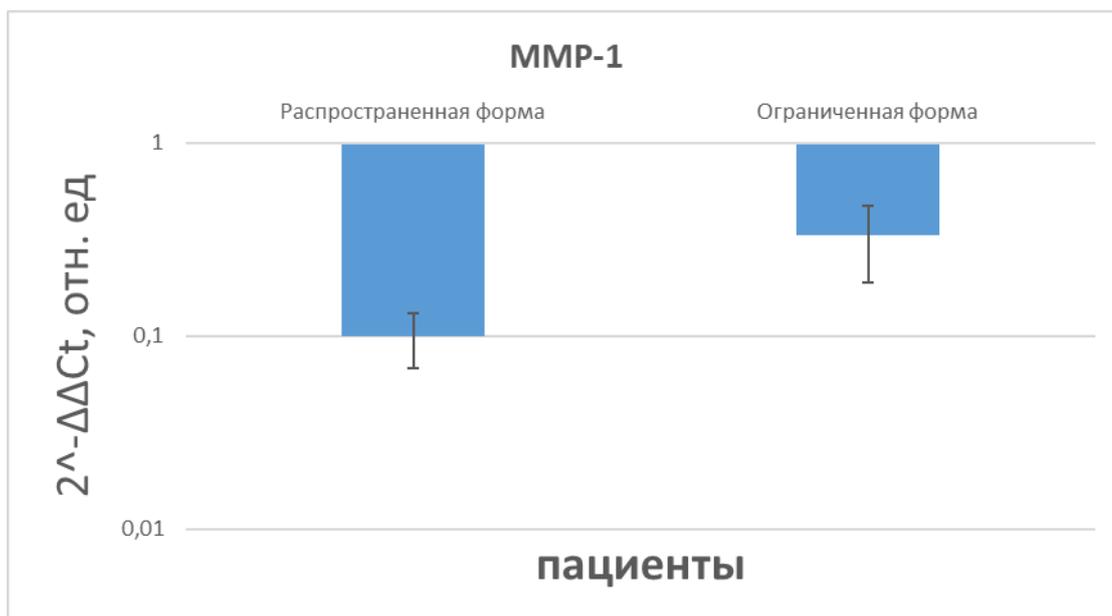


Рисунок 68. Сравнение уровня экспрессии мРНК гена MMP-1 в пораженной коже пациентов с диагнозом локализованная склеродермия с ограниченной и распространенной формой заболевания. В качестве контроля использовали уровень экспрессии в визуально непораженной склеродермией коже, принятый за 1.

Экспрессия гена MMP-1 в пораженной коже пациентов с ограниченной формой заболевания была достоверно понижена в 5,3 раза, а при распространенной форме заболевания – в 11 раз по сравнению с визуально непораженной склеродермией кожи. Примечательно, что экспрессионные данные этих 2 групп достоверно отличаются друг от друга, но утверждать, что пациенты с распространенной формой заболевания отличаются более низким уровнем экспрессии гена MMP-1, преждевременно.

Для этого необходимо более расширенное исследование с увеличением числа пациентов. Тем не менее полученные результаты свидетельствуют о значительном снижении уровня экспрессии гена MMP-1 у всех обследованных нами пациентов с диагнозом локализованной склеродермии. Это согласуется с известными фактами о склеродермии, которая характеризуется избыточным отложением коллагена I и III типов и других белков внеклеточного матрикса. Известно, что MMP-1 обладает высокой коллагенолитической активностью и ответственна за деградацию компонентов внеклеточного матрикса. Следовательно, снижение уровня экспрессии гена MMP-1 является определенным патогенным маркером в развитии склеродермии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов данного исследования можно сделать следующие основные выводы:

- 1) ускоренное тромбообразование, наблюдаемое после первичной адгезии тромбоцитов, может объясняться несколькими эффектами, включающими существенное увеличение скорости сдвига на поверхности закрепленных тромбоцитов, а также эффект сжатия поля скоростей, который значительно увеличивает скорость транспорта молекул и клеток к поверхности первично закрепленных тромбоцитов;
- 2) стабильно высокий уровень цитоплазматического кальция является следствием, а не первопричиной формирования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов;
- 3) фибриноген и интегрин  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  играют существенную роль в связывании fXIII, без любого из этих компонентов фактор XIII не связывается с тромбоцитами;
- 4) с течением времени после активации тромбоцитов АДФ, не происходит изменения степени их активации в процессе агрегации;
- 5) активация тромбоцита через рецептор CLEC-2 лимитируется не только активацией тирозинкиназ, но и скоростью формирования кластера рецепторов;
- 6) разработан метод для оценки взаимодействия иммунной системы и системы гемостаза *ex vivo*;
- 7) разработан тест оценки кальциевой сигнализации в тромбоцитах, основанный на методе проточной цитометрии;
- 8) разработана компьютерная модель активации комплекса внешней теназы на поверхности везикул;
- 9) с помощью математической модели, в которой пространственно-неоднородный лизис предварительно образовавшегося сгустка в сосуде индуцировался ТРА, способным проникать в него посредством диффузии и адвекции, проанализирован вклад различных реакций и участников системы фибринолиза;
- 10) разработана и валидирована фармакодинамическая модель НМГ, учитывающая индивидуальные особенности пациентов, способная описывать состояние гемостаза, наблюдаемой в глобальном тесте тромбодинамика-4д (пространственная генерация тромбина);

- 11) параметры размера тромбоцитов (FSC) и предварительной активации (прокоагулянтные тромбоциты) у 31 взрослого пациента с хронической ИТП, которым был назначен ромиплостим, постепенно снижались до нормальных значений в по мере прохождения цикла терапии;
- 12) гиперкоагуляция с повышенной скоростью роста сгустка в анализе тромбодинамики перед началом цикла ЭКО ассоциирована с повышенным риском негативного исхода программы ЭКО;
- 13) активность эритроцитарных микровезикул ~3 раза превосходит активность микровезикул, происходящих от других клеток крови. Эта активность не определяется фосфатидилсеринем;
- 14) белок EB3 может связываться не только на конце микротрубочки, но и часто накапливается вдоль ее решетки, вблизи конца, образуя «островки»; с помощью компьютерного моделирования было показано, что простой кинетики гидролиза ГТФ в карманах тубулина не достаточно для того, чтобы объяснить стохастическое возникновение ГТФ-островков;
- 15) мотор CENP-E и комплекс Ndc80 представляют собой оптимально устроенную молекулярную систему, способную к конверсии кинетохора из латерального в концевое закрепление *in vitro*;
- 16) разработан алгоритм использования клеточного биочипа в морфологической диагностике острых лейкозов;
- 17) метаболизм фолата в печени крысы представляет собой типичный случай модульной организации клеточного метаболизма с несколькими отдельными метаболическими системами (метаболизм пуринов, метаболизм пиримидина, метаболизм метионина и т. д.), связанными через фолаты и функционирующими практически независимо друг от друга;
- 18) брусатол, дитерпеноид растительного происхождения, действует как избирательный ингибитор eIF5A, а также стимулирует гликолитический путь метаболизма глюкозы, что проявляется в увеличении выработки лактата;
- 19) комбинации имипрамина с никотином и мемантина с каннабинолом являются эффективными средствами торможения экспериментальных паркинсоноподобных нарушений;
- 20) генотип TT замены rs1611115 в гене DBH значимо ассоциирован с псориазом;
- 21) снижение уровня экспрессии гена MMP-1 является определенным патогенным маркером в развитии склеродермии.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Akhmanova A. & Steinmetz M.O. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015. Vol. 16. P. 711–726
2. Augustine R.A. et al. Quantitation of prolactin receptor mRNA in the maternal rat brain during pregnancy and lactation. // *J. Mol. Endocrinol.* 2003. V. 31. P. 221–232
3. Bouvard D. et al. Functional consequences of integrin gene mutations in mice. // *Circ. Res.* 2001. V. 89, № 3. P. 211–223
4. Caliezi C. et al. C1-esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. // *Pharmacol. Rev.* 2000. Vol. 52, № 1. P. 91–112.
5. Cimini M. et al. The MRL mouse heart does not recover ventricular function after a myocardial infarction. // *Cardiovasc Pathol.* 2008. V.17. №1. P. 32-9
6. Di Nisio M. et al. Thrombophilia and outcomes of assisted reproduction technologies: A systematic review and meta-analysis. // *Blood.* 2011. Vol. 118. P. 2670–2678
7. Johnson V et al. Design, overexpression, and purification of polymerization-blocked yeast  $\alpha\beta$ -tubulin mutants. // *Biochemistry.* 2011. Vol. 50. P. 8636–8644
8. Kulkarni S. et al. A revised model of platelet aggregation. // *J. Clin. Invest.* 2000. Vol. 105. P. 783–91
9. Kulski J. et al. Gene expression profiling of Japanese psoriatic skin reveals an increased activity in molecular stress and immune response signals. // *J. Mol. Med.* 2005. V. 83. № 12. P. 64–75
10. Lorand L. Factor XIII: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin. // *Ann N Y Acad Sci.* 2001. Vol. 936. P. 291–311
11. Magina S et al. Catechol-O-methyltransferase activity is higher in psoriasis patients and is down-regulated by narrowband ultraviolet B treatment. // *Eur J Dermatol.* 2013. Vol. 23. P. 49–52
12. McIntosh JR, Volkov V, Ataulakhanov FI, Grishchuk EL. Tubulin depolymerization may be an ancient biological motor. // *J Cell Sci.* 2010. V. 123. P. 3425–3434
13. Ricke R. et al. Bub1 kinase activity drives error correction and mitotic checkpoint control but not tumor suppression. // *J. Cell Biol.* 2012. V. 199. P. 931–949.

14. Salcedo-Sora J.E. & Mc Auley M. T. A mathematical model of microbial folate biosynthesis and utilisation: implications for antifolate development. // *Mol. Biosyst.* 2016. Vol. 12. P. 923–33
15. van Bladel E.R. et al. Functional platelet defects in children with severe chronic ITP as tested with 2 novel assays applicable for low platelet counts. // *Blood.* 2014. Vol. 123, № 10. P. 1556–1563
16. Walczak C. et al. Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010. Vol. 11. P. 91–102
17. Weaver B & Cleveland D. Does aneuploidy cause cancer? // *Curr Opin Cell Biol.* 2006 V. 18. №6. P. 658-67.
18. Weir G. & Bonner-Weir, S. Islet b cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2013. V. 1281. P. 92–105
19. Westein E et al. Monitoring in vitro thrombus formation with novel microfluidic devices. // *Platelets.* 2012. Vol. 23. P. 501–509