

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. N НИОКТР АААА-А18-118012390250-0  
Per. N ИКРБС



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 ХРОМОСОМ В ПРОЦЕССАХ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК,  
ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ, РАЗРАБОТКА НОВЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ  
НАРУШЕНИЙ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И СОЗДАНИЕ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ  
ПЛАЗМОЗАМЕЩАЮЩИХ ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩИХ СРЕДСТВ  
(промежуточный)**

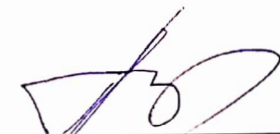
Руководитель НИР,  
Научный руководитель,  
Член-корр. РАН, доктор биол. наук,

 Ф.И. Атауллаханов

Москва 2018

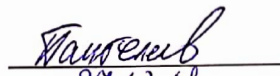
## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, ВРИО директора,  
Научный руководитель,  
д-р.биол.наук, член-корр. РАН

  
27.12.18

Ф.И. Атауллаханов  
(введение, заключение)

Ответственный исполнитель,  
д-р.физ.-мат.наук

  
27.12.18

М.А. Пантелеев  
(введение, заключение)

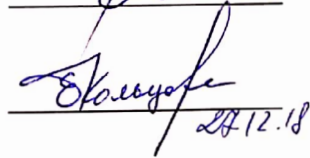
Исполнители:

Зам. директора по науке,  
канд.биол.наук

  
27.12.18

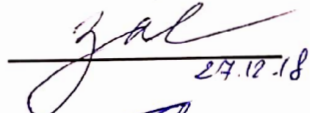
А.Н. Баландина  
(нормоконтроль)

Учёный секретарь., канд.биол.наук

  
27.12.18

Е.М. Кольцова  
(раздел 1)

Зав. группой, канд.биол.наук

  
27.12.18

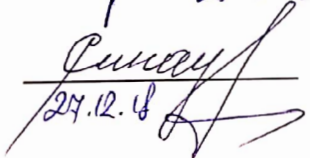
А.В. Зайцев  
(раздел 2)

Ст. научн.сотр., канд.физ.-мат.наук

  
27.12.18

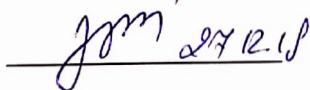
Н.Б. Гудимчук  
(раздел 2)

Зав. лабораторией, д-р.биол.наук

  
27.12.18

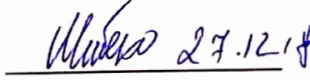
Е.И. Синауридзе  
(раздел 1)

инженер-исследователь,  
канд.биол.наук

  
27.12.18

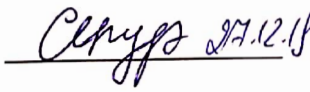
В.А. Волков  
(раздел 2)

Вед. научн.сотр., канд.биол.наук

  
27.12.18

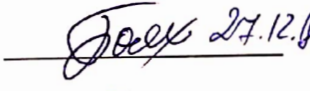
А.М. Шибeko  
(раздел 1)

инженер-исследователь,  
канд.биол.наук

  
27.12.18

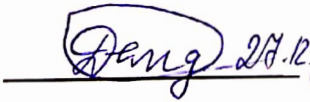
С.С. Суров  
(раздел 1)

Мл.научн.сотр.

  
27.12.18

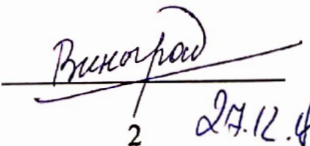
А.В. Бояхчян  
(раздел 2)

Мл.научн.сотр.

  
27.12.18

В.М. Демидов  
(раздел 2)

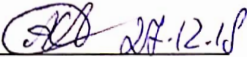
Мл.научн.сотр.

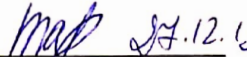
  
27.12.18

Д.С. Виноградов

		(раздел 2)
Стажер-исследователь	<u>Петрунина</u> 27.12.18	Н.А. Петрунина (раздел 1)
Стажер-исследователь	<u>Тарасов</u> 27.12.18	В.А. Тарасовец (раздел 2)
Ст. научн.сотр., канд.биол.наук	<u>Котова</u> 27.12.18	Я.Н. Котова (раздел 1)
Научн.сотр., канд.биол.наук	<u>Артем</u> 27.12.18	Е.О. Артеменко (раздел 1)
Мл.научн.сотр., канд.биол.наук	<u>Габри</u> 27.12.18	Л.И. Габриелян (раздел 1)
Мл.научн.сотр.	<u>Якуш</u> 27.12.18	А.А. Якушева (раздел 1)
Мл.научн.сотр.	<u>Демья</u> 27.12.18	А.С. Демьянова (раздел 1)
Стажер-исследователь	<u>Солов</u> 27.12.18	П.А. Соловьева (раздел 2)
Стажер-исследователь	<u>Филь</u> 27.12.18	А.А. Филькова (раздел 1)
Стажер-исследователь	<u>Уш</u> 27.12.18	О.Е. Ушакова (раздел 1)
Стажер-исследователь	<u>Мас</u> 27.12.18	А.А. Масальцева (раздел 1)
Мл.научн.сотр.	<u>Керимов</u> 27.12.18	Р.Р. Керимов (раздел 1)
Ст. научн.сотр., канд.биол.наук	<u>Подо</u> 27.12.18	Н.А. Подошлелова (раздел 1)
Стажер-исследователь	<u>Мегали</u> 27.12.18	А.Д. Мегалинский (раздел 1)
Научн.сотр., канд.физ.-мат.наук	<u>Нечип</u> 27.12.18	Д.Ю. Нечипуренко (раздел 1)
Научн.сотр.	<u>Глух</u> 27.12.18	А.А. Глухова

(раздел 1)

Зав. лабораторией, канд.биол.наук  27.12.18 А.Н. Свешникова  
(раздел 1)

Вед. научн.сотр., канд.физ.-мат.наук  27.12.18 М.В. Мартынов  
(раздел 1)

Ст. научн.сотр., канд.биол.наук  27.12.18 А.В. Коршунова  
(раздел 2)

Научн.сотр.  27.12.18 С.С. Шахиджанов  
(раздел 2)

Мл.научн.сотр.  27.12.18 Т.А. Коваленко  
(раздел 1)

Ст. научн.сотр., канд.биол.наук  27.12.18 Е.Н. Липец  
(раздел 1)

## РЕФЕРАТ

Отчет 27 с., 1 кн., 7 рис., 2 табл., 8 источн.

### СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ, ФРАКЦИИ ТРОМБОЦИТОВ, ДИАГНОСТИКА СВЕРТЫВАНИЯ, ХРОМОСОМЫ, МИКРОТРУБОЧКИ, ЛАЗЕРНЫЙ ПИНЦЕТ, ДЕЛЕНИЕ КЛЕТКИ

Объект исследования – сложные динамические диссипативные биологические саморегулирующиеся системы, а именно система свертывания крови и веретено деления.

Цель работы – 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.

В процессе работы по изучению регуляции свертывания крови проводили исследование роста тромба в потоке, внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах, прокоагулянтной активности микровезикул, устойчивости распространения фибринового сгустка, нарушений гемостаза новорожденных, разработку новой поверхности для запуска активации свертывания, поиск новых низкомолекулярных ингибиторов факторов Ха и XIa. В рамках изучения процессов деления клетки изучали механизмы исправления ошибок закрепления хромосом в митозе, а также моделировали сборку-разборку тубулиновых микротрубочек.

Основные научные результаты:

1. В ходе формирования артериальных тромбов прокоагулянтные тромбоциты переходят во внешний слой тромба, что ведет к формированию фибриновой оболочки.
2. Циркулирующие в плазме микровезикулы, также как тромбоцитарные и эритроцитарные активируют свертывание по контактному пути.
3. Рост фибринового сгустка в пространстве обладает высокой устойчивостью к возмущениям параметров среды.
4. Гемостаз новорожденных характеризуется гиперкоагуляцией в сочетании со сниженной функциональной активностью тромбоцитов.
5. Обнаружена бистабильность в кинетике этого фермента и показано, что это свойство играет основную роль в крутизне и локализации градиента активности Авроры В.

## СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ .....	2
РЕФЕРАТ .....	5
СОДЕРЖАНИЕ .....	6
ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ .....	7
ВВЕДЕНИЕ .....	8
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ .....	10
1. Исследование системы свертывания крови .....	10
1.1. Рост тромба в потоке.....	10
1.2. Внутриклеточная сигнализация в тромбоцитах .....	11
1.3. Прокоагулянтная активность микровезикул различного происхождения .....	13
1.4. Устойчивость распространения фибринового сгустка .....	14
1.5. Исследование роли неустойчивости в биологических системах — кальциевой сигнализации тромбоцита и системе комплемента.....	14
1.6. Нарушение гемостаза новорожденных .....	20
1.7. Разработка новой поверхности для запуска активации свертывания .....	21
1.8. Поиск новых низкомолекулярных ингибиторов факторов Ха и XIa. ....	23
2. Исследование механизмов деления клетки .....	23
2.1. Механизмы исправления ошибок закрепления хромосом в митозе.....	23
2.2. Моделирование сборки-разборки тубулиновых микротрубочек методом броуновской динамики .....	24
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	26
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	27

## ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

ГТФ – ГуанозинТриФосфат

МВ – микровезикулы

CLEC-2 – рецептор семейства лектиноподобных типа С

IC50 – концентрация полумаксимального ингибирования,

FXa – активированный фактор X

FXIa – активированный фактор XI

TLR4 – толл-подобный рецептор 4

Tlag – время задержки роста сгустка

$V_i$  – начальная скорость роста сгустка

$V_s$  – стационарная скорость роста сгустка

$V$  – скорость роста сгустка

## ВВЕДЕНИЕ

Митоз – один из ключевых клеточных процессов, понимание деталей которого важно как для фундаментальной науки, так и для медицины. Понимание механизмов нарушения митоза, приводящих к анеуплоидии и ошибкам деления, может оказаться принципиально новым направлением коррекции регенеративных процессов в онкологии (Cimini, 2008; Weaver and Cleveland, 2006; Nicholson and Cimini, 2013). 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 резко снизить, если в процессе онкотерапии защитить и усилить механизмы исправления ошибок в процессе деления клеток. Точное распределение генетического материала при делении клетки достигается благодаря взаимодействию хромосом с веретеном деления, состоящим из микротрубочек и десятков других белков. Микротрубочки должны специфично и прочно присоединиться к специализированным мульти-белковым комплексам на хромосомах, называемым кинетохорами. Более того, одна из сестринских хроматид в составе хромосомы должна присоединиться своим кинетохором к микротрубочкам, идущим строго из одного полюса веретена деления, а вторая – к микротрубочкам из другого полюса. Процесс образования этих полярных присоединений называется биориентацией, а ошибки в этом процессе ведут к анеуплоидии, хромосомным болезням и злокачественному перерождению клеток. Случайные присоединения микротрубочек к кинетохорам приводят к примерно равному распределению микротрубочек, пришедших из каждого полюса, на обоих сестринских кинетохорах в хромосоме, что несомненно должно вызывать гибель клеток. Таким образом, на кинетохоре действует активный молекулярный механизм сортировки присоединившихся микротрубочек на «правильные» и «неправильные», причем «неправильные» постоянно отсоединяются.

Механизмы формирования тромбов и репарации сосудов в норме и при разных патологиях являются не только уникально интересными, но и исключительно важными в медицине. Нами недавно установлено экспериментально, что свертывание распространяется



в пространстве как автоволна (Lobanova and Ataulakhanov, 2003, 2004; Атауллаханов et al., 2007; Ataulakhanov et al., 2013, Dashkevich et al., 2012). Параметры этой автоволны несут уникальную информацию о состоянии гемостаза в организме. В настоящем исследовании мы планируем, проведение трансляционных исследований и математическое моделирование процессов репарации сосудов при разных патологиях, пытаюсь с помощью математических моделей выяснить закономерности, общие как для процессов репарации сосудов, так и для процессов формирования градиентов и молекулярных структур в митозе. Это позволит нам выявить особенности нарушения гемостаза при этих патологиях и внести изменения в диагностику и лечение этих заболеваний, а также понять механизмы возникновения анеуплоидии и нарушений процессов деления клетки. Исследования формирования градиентов в митозе и процессов репарации сосудов должны позволить нам провести разработку математических моделей, позволяющих выявлять базовые принципы процессов развития и регенерации в биомедицине.

## **ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

### **1. Исследование системы свертывания крови**

#### **1.1.Рост тромба в потоке**

Формирование тромба в результате повреждения атеросклеротической бляшки является сложным процессом, включающим адгезию и агрегацию тромбоцитов, формирование фибрина и фибринолиз, которые часто происходят в экстремальных гемодинамических условиях, возникающих при стенозе сосуда. Отсутствие адекватных экспериментальных моделей атеротромбоза ограничивает понимание механизмов, регулирующих данный процесс, а также существенно затрудняет разработку новых эффективных антитромботических препаратов. Поэтому, важнейшей подзадачей в рамках данного проекта является разработка новой *ex vivo* модели атеротромбоза. Реализация данного проекта позволит значительно расширить фундаментальные представления о процессе формирования тромбов в условиях артериального русла, что в перспективе позволит значительно усовершенствовать методы борьбы с артериальными тромбозами. Так как осложнения, вызванные артериальным тромбозом (например - инфаркт миокарда и ишемические инсульты) – являются лидирующими причинами смерти и инвалидности граждан, данный проект непосредственным образом связан с формированием важнейшего научного задела, обеспечивающего как экономический рост, так и социальное развитие нашей страны.

В проведенном нами исследовании было показано, что после активации в месте повреждения сосудов тромбоциты дифференцируются в две субпопуляции, проявляя либо агрегационный, либо прокоагулянтный фенотип. Хотя функциональная роль проагрегационных тромбоцитов хорошо известна, физиологическое значение прокоагулянтных тромбоцитов, динамика их образования и пространственное распределение при тромбе остаются неясными. Используя трансмиссионную электронную микроскопию и флуоресцентную микроскопию артериальных тромбов, сформированных *in vivo* после индуцированного хлоридом железа повреждения каротидной артерии или механического повреждения брюшной аорты у мышей, мы показали, что в ходе формирования артериальных тромбов прокоагулянтные (некротические) тромбоциты переходят во внешний слой тромба

под действием контракции, что ведет к формированию фибриновой оболочки на поверхности тромба (Рис. 1).

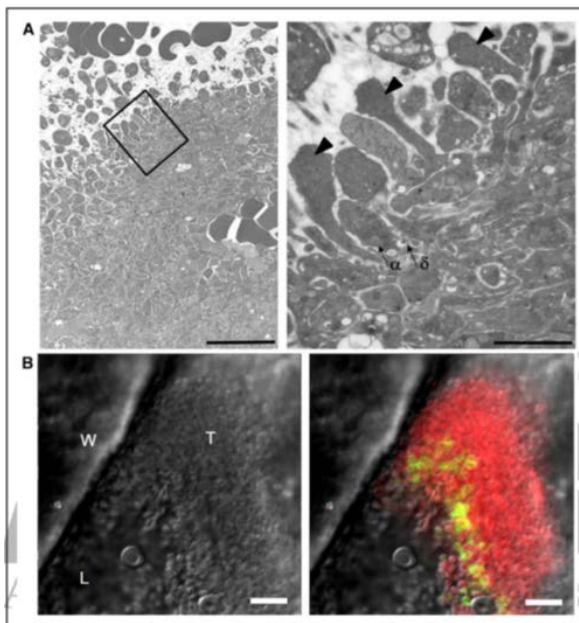


Рис. 1. Распределение прокоагулянтных тромбоцитов в тромбах у мышей.

## 1.2. Внутриклеточная сигнализация в тромбоцитах

В рамках выполнения плана была отлажена методика длительного измерения концентрации ионов кальция в цитозоле тромбоцита на микроскопе (Рис. 2) и на проточном цитометре. Предложены схемы внутриклеточной сигнализации при активации тромбоцита через ассоциированные с тирозин-киназами рецепторы.

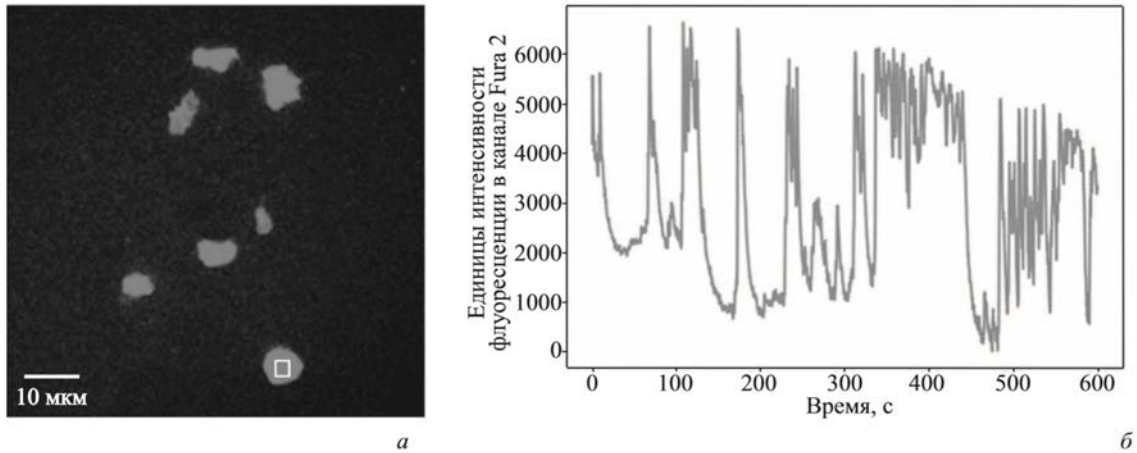


Рис.2. Определение динамики концентрации кальция в тромбоците методом микроскопии полного внутреннего отражения. а. Типичная микрофотография области образца при освещении лазером длиной волны 405 нм. Белым квадратом показана область оценки флуоресценции. б. Типичная зависимость средней интенсивности флуоресценции в выделенной области от времени для одной области.

Также разработан алгоритм построения компьютерной модели внутриклеточной сигнализации (Рис. 3). Построены компьютерные модели активации тромбоцита через рецепторы TLR4 и CLEC-2.

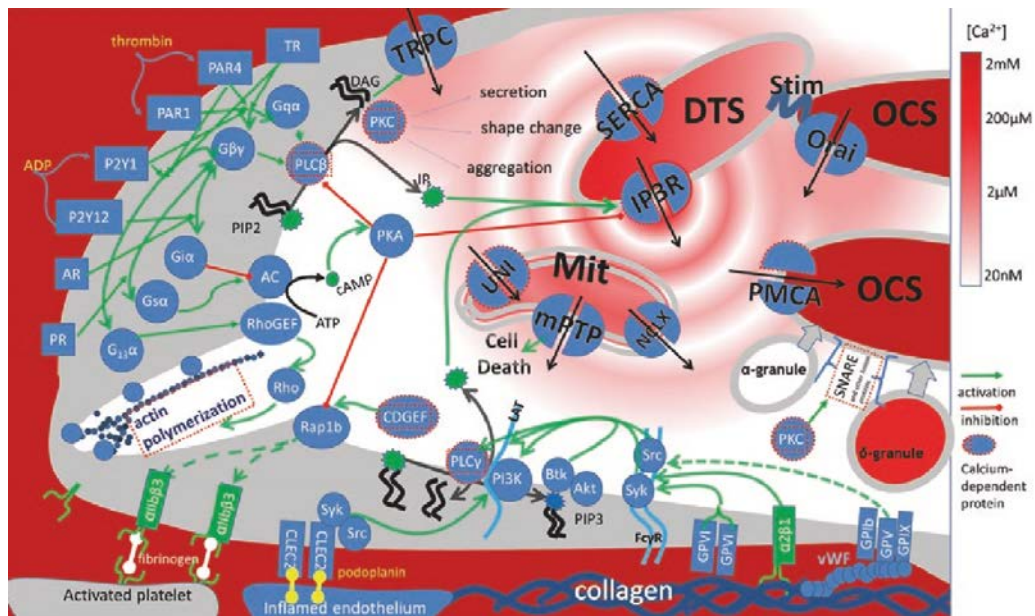


Рис.3. Схема, демонстрирующая сложность сигнальных сетей с множественным механизмом обратной связи и перекрестными помехами, которые лежат в основе активации тромбоцитов.

### 1.3. Проконгулянтная активность микровезикул различного происхождения

По влиянию на распространение свёртывания эритроцитарные микровезикулы (МВ) превосходят МВ, выделенных из плазмы здоровых доноров и полученных из тромбоцитов, моноцитов и эндотелиальной культуры в 3 раза. Активность МВ, выделенных из эритроцитов нормальных доноров, не отличается от МВ, выделенных из эритроцитов пациентов с микросфероцитозом, но существенно выше активности МВ, выделенных из эритроцитов пациентов с бетта-талассемией.

Циркулирующие в плазме микровезикулы активируют свёртывание сильнее, чем микровезикулы, полученные из тех же клеток *in vitro*. Эта активность не объясняется связыванием активных факторов контактного пути из плазмы.

Для многих патологических состояний показано, что МВ являются одним из факторов гиперкоагуляции. Их проконгулянтная активность может определяться типом клеток, от которых они происходят, либо некоторыми другими факторами, такими как изменение состояния клеток при патологии или взаимодействие МВ с компонентами плазмы. В данной работе мы сравнивали влияние МВ, выделенных из плазмы здоровых доноров и полученных из тромбоцитов, эритроцитов, моноцитов и эндотелиальной культуры на скорость роста сгустка и на активацию свёртывания в плазме. Эритроцитарные МВ способны увеличивать стационарную скорость роста сгустка на  $30 \pm 10$  мкм/мин, в то время как МВ, происходящие от других клеток крови, - на 7-9 мкм/мин, искусственные фосфолипидные везикулы – на  $15,6 \pm 0,4$  мкм/мин. Активность МВ, выделенных из эритроцитов нормальных доноров, не отличается от МВ, выделенных из эритроцитов пациентов с микросфероцитозом, но существенно выше активности МВ, выделенных из эритроцитов пациентов с бетта-талассемией.

Циркулирующие в плазме МВ, также как тромбоцитарные и эритроцитарные активируют плазму по контактному пути. По силе активации МВ, циркулирующие в плазме, значительно превосходят тромбоцитарные и эритроцитарные. Таким образом их активность не объясняется суммарным вкладом МВ того же происхождения, но полученных *in vitro*. Инкубация циркулирующих в плазме, тромбоцитарных, эритроцитарных и МВ из эндотелиальной культуры с фактором XIa и калликреином не меняет их активность. Следовательно, повышенная активность циркулирующих в плазме МВ не объясняется связыванием активных факторов контактного пути из плазмы.

#### 1.4. Устойчивость распространения фибринового сгустка

Свертывание крови представляет собой тонко регулируемый пространственно-временной процесс, который приводит к образованию фибриновых сгустков, предотвращающих кровопотерю при повреждении сосудов. Чувствительность системы свертывания была ранее исследована без учета транспортных процессов. Чтобы исследовать его чувствительность к недостаткам фактора свертывания в пространственной реакционно-диффузионной системе, мы объединили экспериментальный дизайн *in vitro* с моделью вычислительной системной биологии. Образование сгустка в плазме без тромбоцитов, дополненной фосфолипидами, активировали иммобилизованным на поверхности тканевым фактором. Мы обнаружили, что комбинация трех свойств системы свертывания: надпороговой локальной концентрации активатора, распределения контроля диффузии между факторами свертывания и потребности в крайне низкой концентрации тромбина для полноценного формирования сгустка – обеспечивает устойчивость роста сгустка в пространственно-неоднородной системе (Рис. 4).

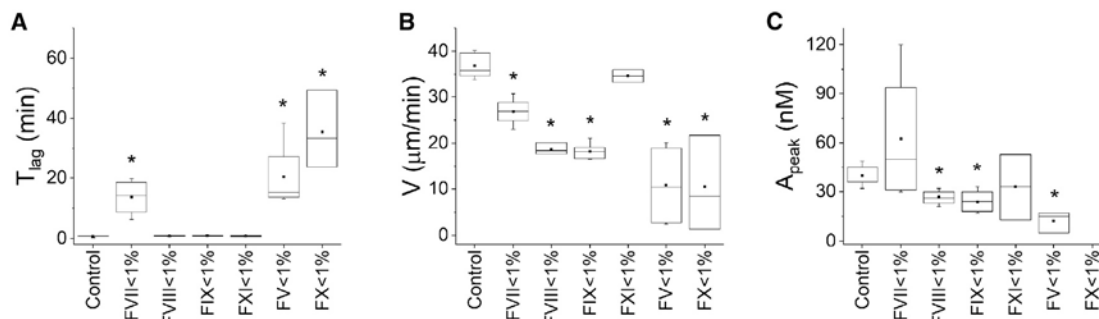


Рис.4. Параметры роста сгустка (лаг-тайм – А, скорость роста сгустка – В) и генерации тромбина (амплитуда волны тромбина – С) в нормальной плазме и плазмах, дефицитных по факторам свертывания V, VII, VIII, IX, X и XI.

#### 1.5. Исследование роли неустойчивости в биологических системах — кальциевой сигнализации тромбоцита и системе комплемента

Активация тромбоцитов крови сопровождается возникновением осцилляций концентрации ионов кальция в цитозоле, которые выполняют функции передатчика информации от мембраны клетки внутрь. Вход ионов кальция в цитозоль тромбоцита, индуцированный рядом рецепторов на мембране клетки, является центральным событием в

процессе активации. Интересной особенностью тромбоцитов является то, что практически все внешние сигналы сходятся в клетке на один приемник --- систему генерации кальциевых осцилляций. Суммарная сила входных сигналов преобразуется в почти пропорциональное увеличение частоты осцилляций. Развитие методов биохимии и микроскопии позволяет наблюдать осцилляции концентрации кальция в одиночных тромбоцитах с высоким разрешением. Анализ механизмов развития осцилляций методами нелинейной динамики показывает, что в клетке реализован специальный динамический осциллятор с жестким возбуждением колебаний. Это приводит к тому, что ответ клетки оказывается пороговым --- крайне важное биологическое свойство, позволяющее клетке не реагировать на случайные флуктуации. Вторая особенность этой динамической системы, состоит в том, что жесткое возбуждение колебаний позволяет устроить практически линейное увеличение частоты колебаний в ответ на увеличение входных сигналов. А последовательное увеличение частоты колебаний в ответ на все более сильные активирующие сигналы, позволяет клетке последовательно включать все больше разных систем, необходимых для надежной работы системы свертывания крови (Рис. 5).

Из-за наличия петли положительной обратной связи в системе комплемента возникает бистабильность. Это приводит к тому, что система отвечает пороговым образом. Это позволяет ей отсеивать сигналы активации, возникающие спонтанно, но при этом она сохраняет способность отвечать на полную мощность при попадании в организм патогенных клеток. Также бистабильное поведение системы комплемента может, гипотетически, приводить к развитию заболевания системы комплемента, например, атипичного гемолитико-уремического синдрома (Рис. 6).

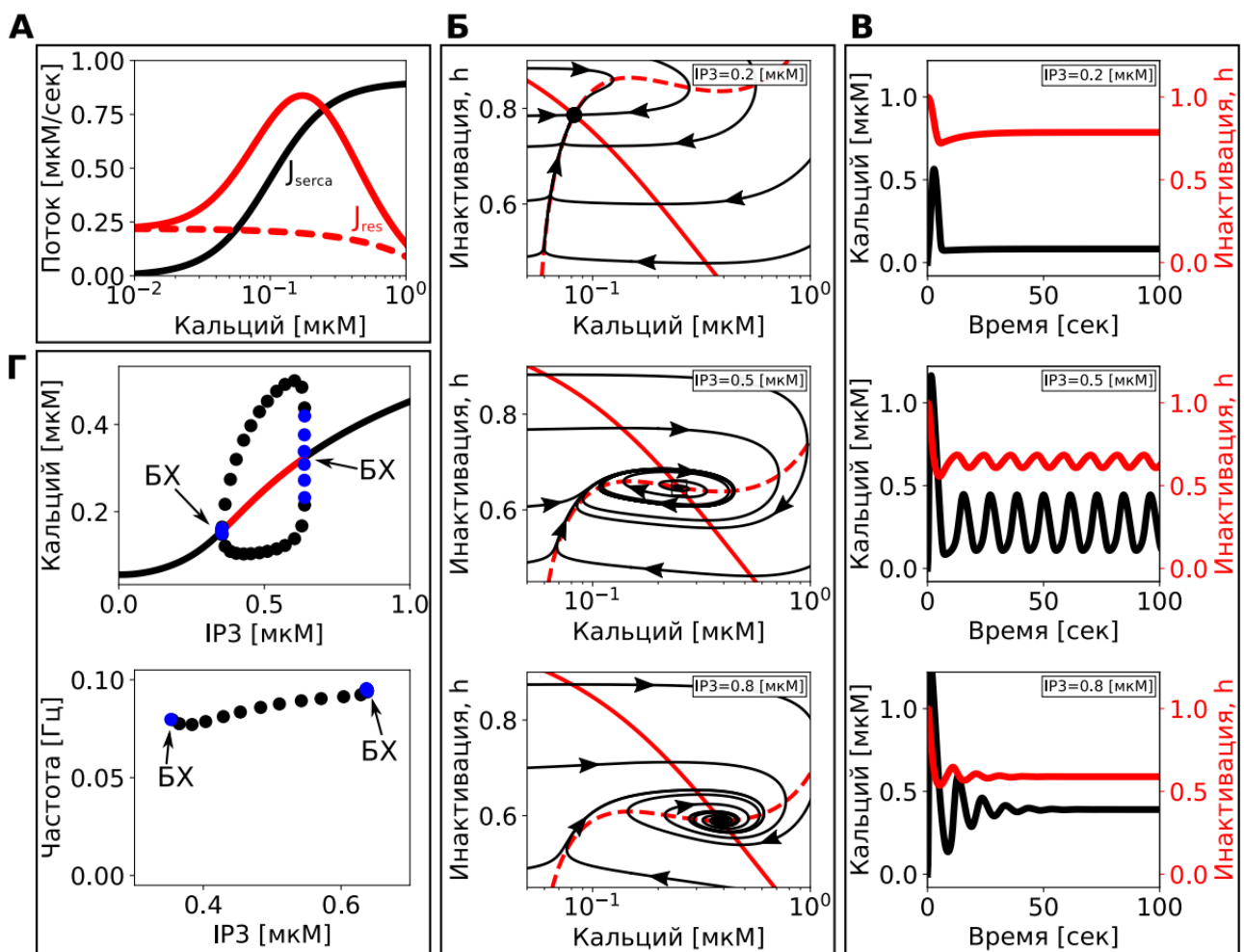


Рис. 5. Простейшая модель осцилляции концентрации кальция, в которой внешний сигнал управляет амплитудой колебаний. (А) - Показаны зависимость стационарной скорости потоков  $J_{res} = IP3R + Leak$  (красный) и  $J_{serca}$  (черный) в зависимости от концентрации кальция в цитозоле. Поток  $J_{res}$  показан для двух концентраций IP3 - 0 (прерывистая линия) и 0.5  $\mu\text{M}$  (сплошная). Эти зависимости имеют одну точку пересечения. В ней скорости выхода кальция из DTS и его закачивания обратно равны - это положение равновесия. Зависимости получены при  $IP3 = 0.5 \mu\text{M}$ . (Б) - Показаны фазовые портреты системы при различных концентрация IP3 в цитозоле. Черные кривые со стрелками показывают траектории движения системы, красная прерывистая кривая - изоклина  $dc/dt=0$ , непрерывная красная кривая - изоклина  $dh/dt=0$ , При концентрации  $IP3 = 0.2 \mu\text{M}$  (верхний рисунок) в системе имеется одно положение равновесия - устойчивый узел. При  $IP3 = 0.5 \mu\text{M}$  (средний рисунок) имеется устойчивый предельный цикл. При  $IP3 = 0.8 \mu\text{M}$  (нижний рисунок) в системе имеется устойчивый фокус. (В) - Динамика концентрация кальция (черная кривая) во времени и переменной  $h$  (обозначающей инактивацию IP3R, красная кривая) во времени при



различных концентрациях  $IP3 = 0.2, 0.5$  и  $0.8$  [мкМ] (сверху вниз соответственно). (Г) - Бифуркационные диаграммы. Непрерывной черной линией показано устойчивое положение равновесия системы. Красной линией показано неустойчивое положение равновесия. Синими точками показана амплитуда кальциевых неустойчивых осцилляций кальция. Черными точками показана амплитуда устойчивых осцилляций кальция. На верхнем рисунке показано, что при увеличении концентрации  $IP3$  в цитозоле в системе происходит бифуркация Пуанкаре-Андропова-Хопфа (БХ) - устойчивая точка теряет устойчивость, возникает предельный цикл и происходит мягкое возбуждение осцилляций. При дальнейшем увеличении концентрации  $IP3$  увеличивается величина осцилляций - предельный цикл увеличивается в размерах. При достижении некоторой концентрации  $IP3$  в системе снова происходит бифуркация Пуанкаре-Андропова-Хопфа, которая превращает устойчивый предельный цикл в устойчивый фокус. На нижнем рисунке показана частота осцилляций концентрации кальция в зависимости от концентрации  $IP3$  - она меняется слабо.

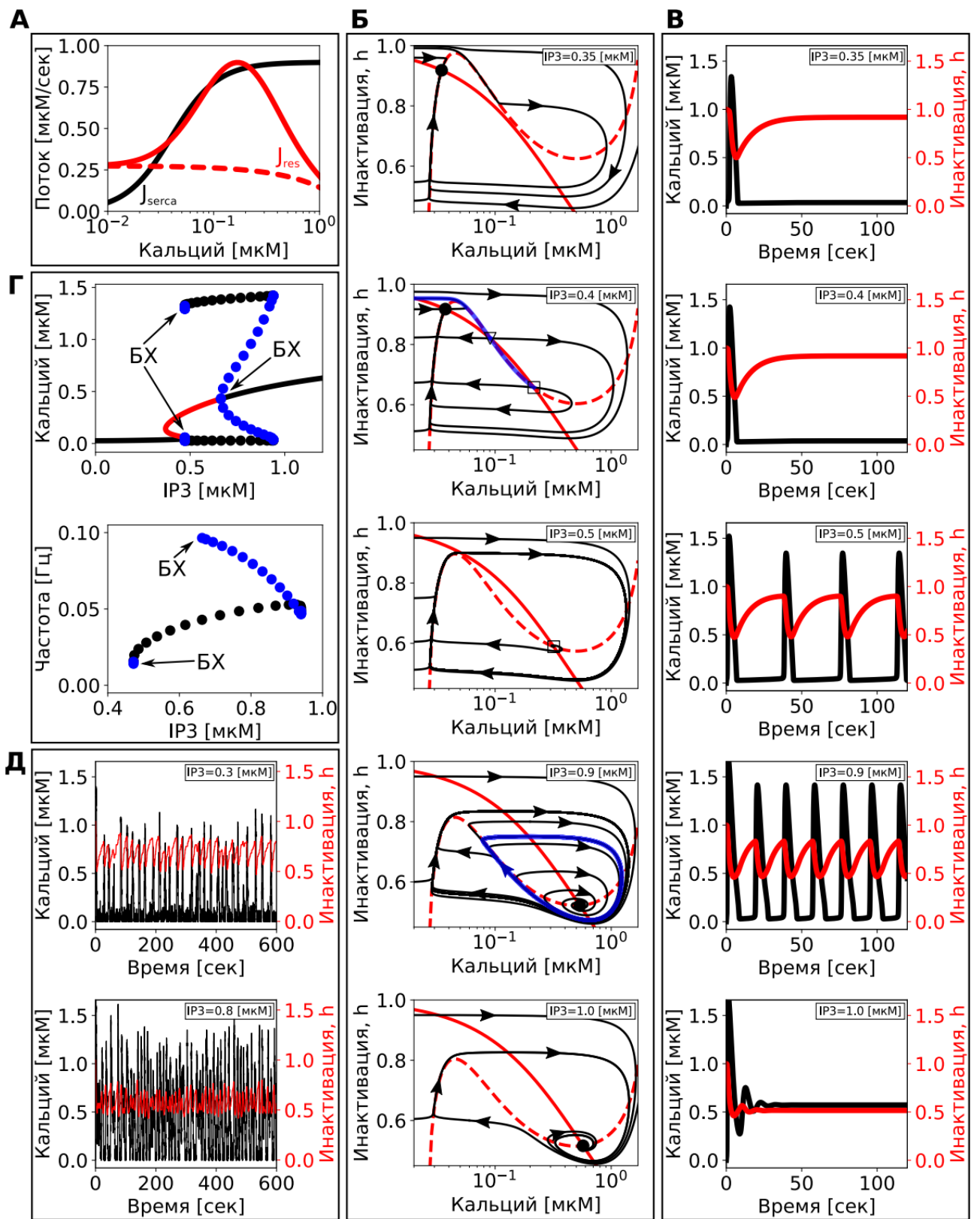


Рис. 6. Модель осцилляций концентрации кальция, в которой внешний сигнал управляет частотой колебаний. (А) - Показаны зависимость стационарной скорости потоков  $J_{res} =$

$IP3R+J_{\text{leak}}$  (красный) и  $J_{\text{serca}}$  (черный) в зависимости от концентрации кальция в цитозоле. Поток  $J_{\text{res}}$  показан для двух концентраций  $IP3$  - 0 (прерывистая линия) и 0.4  $\mu\text{M}$  (сплошная). Из-за изменения параметра  $K3$  черная кривая  $J_{\text{serca}}$  сдвинулась влево (по сравнению с рис. 6А) вследствие чего образовалось ещё две точки пересечения. Зависимости получены при  $IP3 = 0.4$  [ $\mu\text{M}$ ]. (Б) - Показаны фазовые портреты системы при 0.35, 0.4, 0.5, 0.9 и 1.0 [ $\mu\text{M}$ ]  $IP3$  в цитозоле (сверху вниз). Черные кривые со стрелками показывают траектории движения системы, красная прерывистая кривая - изоклина  $dc/dt=0$ , непрерывная красная кривая - изоклина  $dh/dt=0$ . Синяя кривая - сепаратриса. При концентрации  $IP3 = 0.35$  [ $\mu\text{M}$ ] (верхний) в системе имеется одно положение равновесия - устойчивый узел. При  $IP3 = 0.4$  [ $\mu\text{M}$ ] (второй сверху) в системе появляется еще две особые точки - седло (треугольник) и неустойчивый узел (квадрат). Синяя кривая является сепаратрисой и обозначает входящие ветви седла. При увеличении концентрации  $IP3$  до 0.5 [ $\mu\text{M}$ ] (третий) из системы исчезают две особые точки, остается неустойчивый фокус вокруг которого образуется устойчивый предельный цикл. При  $IP3 = 0.9$  [ $\mu\text{M}$ ] (четвертый сверху) в системе имеется два предельных цикла - в устойчивом предельном цикле возникает неустойчивый предельный цикл (который является сепаратрисой (синяя кривая)). При  $IP3 = 1.0$  [ $\mu\text{M}$ ] (нижний) в системе остается только устойчивый фокус. (В) - Динамика концентрации кальция (черная кривая) во времени и переменной  $h$  (обозначающей инактивацию  $IP3R$ , красная кривая) во времени при различных концентрациях  $IP3 = 0.35, 0.4, 0.5, 0.9$  и  $1.0$  [ $\mu\text{M}$ ] (сверху вниз соответственно). (Г) - Бифуркационные диаграммы. Непрерывной черной линией показано устойчивое положение равновесия системы. Красной линией показано неустойчивое положение равновесия. Синими точками показана амплитуда кальциевых неустойчивых осцилляций кальция. Черными точками показана амплитуда устойчивых осцилляций кальция. На верхнем рисунке показано, что при увеличении концентрации  $IP3$  в системе сначала образуется две неустойчивых состояния. Затем происходит бифуркация Пуанкаре-Андронova-Хопфа - возникает предельный цикл и происходит жесткое возбуждение осцилляций. При этом амплитуда осцилляций кальция практически не изменяется. При достижении некоторой концентрации  $IP3$  в системе снова происходит бифуркация Пуанкаре-Андронova-Хопфа и внутри устойчивого предельного цикла возникает неустойчивый, который увеличивается в размерах пока не поглощает устойчивый предельный цикл, что приводит к тому, что в системе остается только устойчивый фокус. На нижнем рисунке показана частота осцилляций концентрации кальция в зависимости от концентрации  $IP3$  - в этом случае

происходит ее увеличении при увеличении концентрации IP3. (Д) - Стохастическое моделирование осцилляций концентрации кальция в простейшей модели методом Гиллеспи. Из малого количества молекул кальция в тромбоците случайные процессы приводят к возникновению редких скачков концентрации кальция уже при  $IP3 = 0.3$  [мкМ] (верхний). С повышением концентрации до  $IP3 = 0.8$  [мкМ] (нижний) происходит увеличение количества этих скачков концентрации. Черная зависимость отражает концентрацию  $Ca^{2+}$ , красная - инактивацию рецепторов h.

### **1.6.Нарушение гемостаза новорожденных**

Система свертывания крови (гемостаз) предотвращает потерю крови при повреждении стенки сосуда путем создания локальной “затычки” – тромба, состоящего из форменных элементов крови и нерастворимой полимерной сети из фибрина. Не смотря на большое количество регулирующих работу этой системы компонентов, у людей часто возникают нарушения в виде ложного срабатывания системы (тромбозы) или недостаточного тромбообразования (кровотечения). В самых сложных ситуациях, таких как сепсис, эти нарушения быстро сменяют друг друга.

Особенностью системы гемостаза новорожденных является то, что концентрации факторов свертывания и их ингибиторов существенно ниже нормы. При этом диапазон нормальных значений новорожденных много шире “взрослого” диапазона. Так как важно не только и не столько количество белков в крови, сколько их соотношение, то у новорожденных возможны ситуации, когда при флуктуации концентраций отдельных белков в пределах относительно нормального диапазона для новорожденных, баланс системы существенно сдвинут либо в область гипокоагуляции либо в область гиперкоагуляции, что может приводить к клинически значимым тромбозам и кровоточивости. Наибольшая частота таких осложнений встречается у недоношенных новорожденных. При этом, использование рутинных тестов гемостаза (таких как времена свертывания) у новорожденных мало информативно, что обуславливается высокой чувствительностью таких тестов к отдельным факторам свертывания, а не к балансу в целом.

Для того, чтобы определить состояние плазменного и тромбоцитарного гемостаза у здоровых и умеренно недоношенных новорожденных в раннем неонатальном периоде, был исследован гемостаз доношенных и недоношенных новорожденных. Было показано, что гемостаз новорожденных характеризуется гиперкоагуляцией в сочетании со сниженной

функциональной активностью тромбоцитов. У умеренно недоношенных и доношенных новорожденных параметры коагуляции не различаются, в то время как некоторые функциональные реакции тромбоцитов у умеренно недоношенных новорожденных ниже, чем у доношенных (Рис. 7).

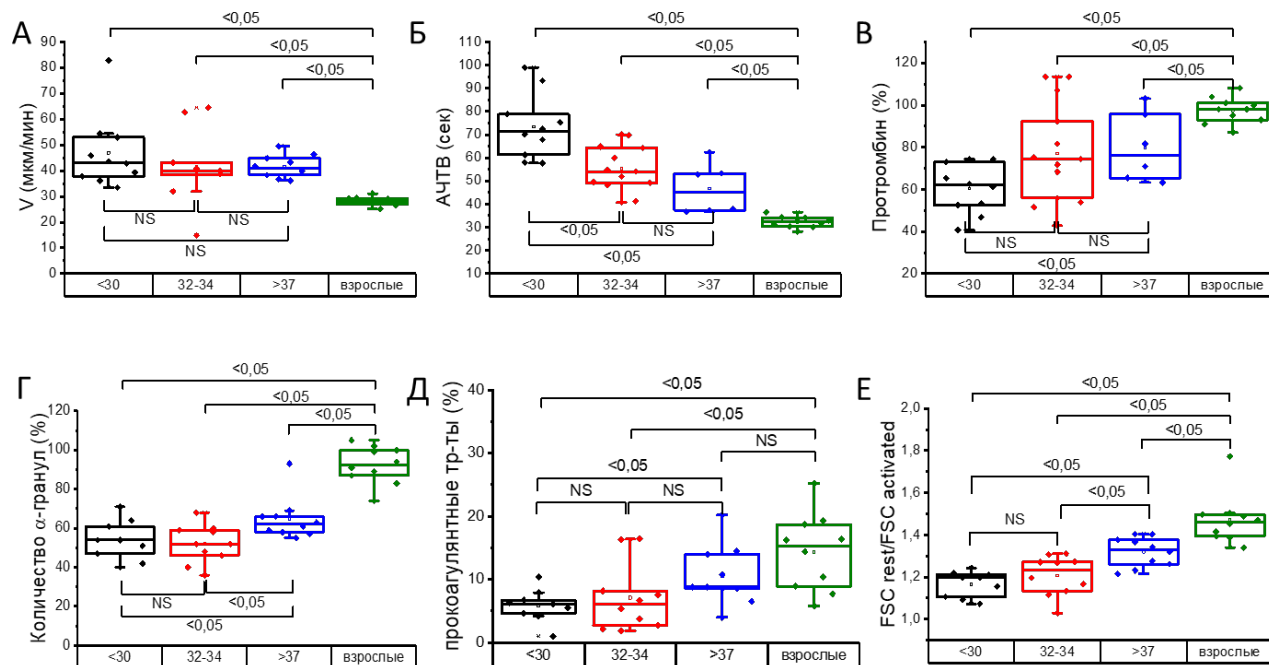


Рис. 7. Показатели гемостаза новорожденных (доношенных и недоношенных) в сравнении с показателями взрослых. А) Скорость роста сгустка в тесте тромбодинамика, Б) АЧТВ, В) Протромбин по Квику, Г) количество альфа-гранул, Д) доля про-коагулянтных (фосфатидилсерин-положительных) тромбоцитов и Е) изменение прямого рассеяния тромбоцитов при активации.

### 1.7. Разработка новой поверхности для запуска активации свертывания

За основу разработки методики иммобилизации тканевого фактора на активатор была взята методика, разработанная ранее. На активированную поверхность активатора через глутаровый альдегид присоединяли белок тканевой фактор. Образующиеся Шиффовы основания восстанавливали борогидридом натрия. Пробовали несколько концентраций борогидрида натрия: 2 г/л, 0,4 г/л, 0,04 г/л, 0,7 г/л. При использовании этих концентраций были получены активаторы со следующими характеристиками роста сгустка по Тромбодинамике (Таблица 1).

Таблица 1.

<b>Борогидрид натрия, конц.</b>	<b>Tlag, мин</b>	<b>Vi, мкм/мин</b>	<b>Vs, мкм/мин</b>
<b>2 г/л</b>	1,2±0,2	59,2±1,9	29,1±0,96
<b>0,4 г/л</b>	1,4±0,2	56,9±0,9	27,8±0,5
<b>0,04 г/л</b>	2,2±0,4	58,2±1,7	30,6±0,6
<b>0,7 г/л</b>	1,0±0,2	65,6±1,5	33,6±0,6
<b>Стандартный активатор</b>	0,9±0,2	53±2,6	27±1

Второй вариант восстановления Шиффовых оснований – это восстановление цианоборогидридом натрия. Была подобрана концентрация цианоборогидрида натрия 5г/л, для блокировки свободных альдегидных групп использовали лизин. Результаты Тромбодинамики при использовании этих активаторов приведены в Таблице 2.

Таблица 2.

<b>Цианоборогидрид натрия, конц.</b>	<b>Tlag, мин</b>	<b>Vi, мкм/мин</b>	<b>Vs, мкм/мин</b>
<b>5 г/л</b>	1,1±0,2	53±3,4	26,6±1,5
<b>Стандартный активатор</b>	0,9±0,2	53±2,6	27±1

Цианоборогидрид натрия - слабый восстановитель, восстанавливает только Шиффовы основания, в отличие от борогидрида натрия, который восстанавливает еще и оставшиеся свободными альдегидные группы. Скорости роста сгустка завышены при использовании активаторов, сделанных с борогидридом натрия. При использовании активаторов, сделанных с цианоборогидридом, получили параметры роста сгустка близкие к стандартному активатору. Предпочтительно использовать методику с восстановлением Шиффовых оснований цианоборогидридом натрия.

Таким образом, в результате проведенной работы были подобраны концентрации борогидрида натрия и цианоборогидрида натрия. Разработана методика иммобилизации тканевого фактора и получены активаторы с необходимыми характеристиками.

## **1.8. Поиск новых низкомолекулярных ингибиторов факторов Xa и XIa.**

В рамках данной темы было проверено 48 потенциальных ингибиторов фактора Xa (FXa). Из них 7 обладали IC50 менее 5 мкМ, однако все эти вещества образуют в водном растворе агрегаты, и специфичность их действия под вопросом.

Из 71 потенциального ингибитора фактора XIa (FXIa) 6 обладали IC50 порядка десятков мкМ. Их механизм действия и специфичность под вопросом.

## **2. Исследование механизмов деления клетки**

### **2.1. Механизмы исправления ошибок закрепления хромосом в митозе**

Точное распределение генетического материала при делении клетки достигается благодаря взаимодействию хромосом с веретеном деления, состоящим из микротрубочек и десятков других белков. Микротрубочки должны специфично и прочно присоединиться к специализированным мульти-белковым комплексам на хромосомах, называемым кинетохорами. Более того, одна из сестринских хроматид в составе хромосомы должна присоединиться своим кинетохором к микротрубочкам, идущим строго из одного полюса веретена деления, а вторая – к микротрубочкам из другого полюса. Процесс образования этих полярных присоединений называется биориентацией, а ошибки в этом процессе ведут к анеуплоидии, хромосомным болезням и злокачественному перерождению клеток. Случайные присоединения микротрубочек к кинетохорам приводят к примерно равному распределению микротрубочек, пришедших из каждого полюса, на обоих сестринских кинетохорах в хромосоме, что несомненно должно вызывать гибель клеток. Таким образом, на кинетохоре действует активный молекулярный механизм сортировки присоединившихся микротрубочек на «правильные» и «неправильные», причем «неправильные» постоянно отсоединяются. Предполагается, что такая сортировка может происходить за счет градиента активности киназы Aurora B, которая может фосфорилировать компоненты кинетохора и таким образом снижать силу связывания с ним микротрубочек. Считается, что эта киназа наиболее активна вблизи межкинетохорной области, а по мере удаления ее активность ослабевает. Таким образом, по мере отсоединения «неправильных» микротрубочек растяжение сестринских кинетохоров полюсами веретена деления увеличивается, что ведет к снижению уровня фосфорилирования и стабилизации связи микротрубочек с кинетохором. Вопрос о том, как формируется и поддерживается градиент активности Aurora B, является одним из наиболее

критических и загадочных в митозе. Киназа Aurora B – одна из перспективных молекулярных мишеней для нового поколения противоопухолевых препаратов, однако механизм ее работы остается на сегодня невыясненным. Нами обнаружена бистабильность в кинетике этого фермента и показано, что это свойство играет основную роль в крутизне и локализации градиента активности Авроры B (Рис. 8).

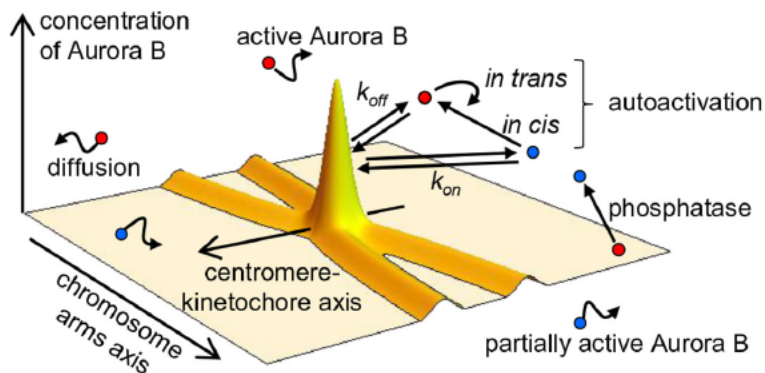


Рис. 8. Формирование градиента Авроры B киназы вокруг центромерной области хромосомы определяется бистабильностью кинетики активации Авроры B. Активная Аврора B показана красным, неактивная – синим. Процесс автоактивации Авроры B, показанный треугольником реакций автоактивации, совместно с реакцией инактивации за счет фосфатазы, приводит к бистабильности в активности Авроры B. В результате вокруг центромерной области возникает острый пик активности киназы. В этой области происходит фосфорилирование кинетохорных белков, связывающих микротрубочки. Правильно закрепленные микротрубочки вытягивают белки кинетохора из этой области, тем самым стабилизируя свою связь с хромосомой. Неправильно закрепленные микротрубочки втягиваются в область пика и быстро открепляются от хромосомы.

## 2.2. Моделирование сборки-разборки тубулиновых микротрубочек методом броуновской динамики

В данном исследовании мы изучали микротрубочки – динамические полимеры белка тубулина. Они представляют собой основной компонент клеточного цитоскелета и митотического веретена деления. Одно из фундаментальных свойств микротрубочки – динамическая нестабильность, которая характеризуется способностью микротрубочек переходить от фазы роста к деполимеризации (т.н. катастрофы) и обратно от деполимеризации к росту (спасения). В 2018 году нами продемонстрировано, что модель



микротрубочки с изогнутыми протофиламентами на конце удовлетворяет экспериментальным о зависимостях скоростей роста и формы концов микротрубочек при разных концентрациях тубулина. Предсказанные моделью формы концов микротрубочек сопоставлены со структурными данными криоэлектронной томографии (полученными в сотрудничестве с лабораторией Р.МакИнтоша, США), и обнаружено хорошее соответствие теории и эксперимента. Предсказаны соотношения изгибных жесткостей, свободных энергий латеральных и продольных связей между тубулинами, обеспечивающие полимеризацию и деполимеризацию микротрубочек. Показано, что гидролизу ГТФ должно соответствовать небольшое уменьшение глубины латеральных и продольных связей (Рис. 8). Совокупно, результаты подтверждают ранее сформулированную нами гипотезу о новом механизме полимеризации микротрубочек путем выпрямления изогнутых ГТФ-тубулиновых протофиламентов.

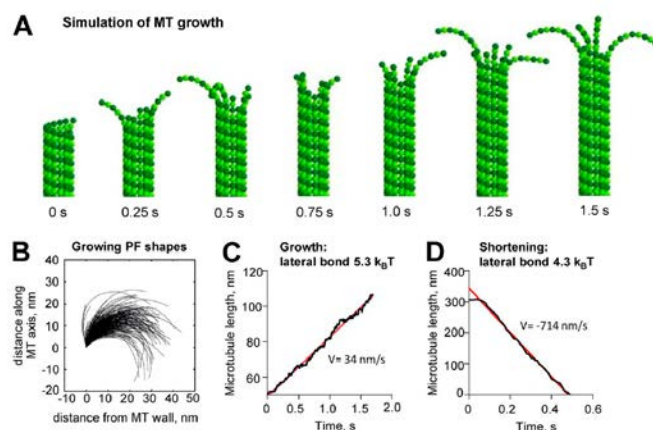


Рис. 9. Механизм роста микротрубочек с искривленными протофиламентами, иллюстрированный моделью броуновской динамики. А. Рост микротрубочки в модели с изогнутыми ГТФ-тубулинами. В. Формы смоделированных протофиламентов на растущем кончике МТ. С. Зависимость длины микротрубочки от времени при моделировании с боковой связью 5.3 кТ, что дает скорость полимеризации  $V = 34 \text{ нм} / \text{с}$ . D. Зависимость длины микротрубочки от времени при моделировании с боковыми связями 4.3 кТ, что дает скорость деполимеризации  $v = 714 \text{ нм} / \text{с}$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Исследование системы свертывания

1. В ходе формирования артериальных тромбов прокоагулянтные тромбоциты переходят во внешний слой тромба, что ведет к формированию фибриновой оболочки.
2. Циркулирующие в плазме микровезикулы, также как тромбоцитарные и эритроцитарные активируют свертывание по контактному пути.
3. Рост фибринового сгустка в пространстве обладает высокой устойчивостью к возмущениям параметров среды.
4. Гемостаз новорожденных характеризуется гиперкоагуляцией в сочетании со сниженной функциональной активностью тромбоцитов.

### Исследование механизмов деления клетки

5. Обнаружена бистабильность в кинетике этого фермента и показано, что это свойство играет основную роль в крутизне и локализации градиента активности Авроры В.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Cimini M, Fazel S, Fujii H, Zhou S, Tang G, Weisel RD, Li RK. The MRL mouse heart does not recover ventricular function after a myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol*. 2008 Jan-Feb;17(1):32-9.
2. Weaver BA, Cleveland DW. Does aneuploidy cause cancer? *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Dec;18(6):658-67.
3. Nicholson JM, Cimini D. Cancer karyotypes: survival of the fittest. *Front Oncol*. 2013 Jun 7;3:148.
4. Lobanova ES, Ataullakhanov FI. Unstable trigger waves induce various intricate dynamic regimes in a reaction-diffusion system of blood clotting. *Phys Rev Lett*. 2003 Sep 26;91(13):138301.
5. Lobanova ES, Ataullakhanov FI. Running pulses of complex shape in a reaction-diffusion model. *Phys Rev Lett*. 2004 Aug 27;93(9):098303.
6. Атауллаханов Ф.И., Лобанова Е.С., Морозова О.Л., Шноль Э.Э., Ермакова Е.А., Бутылин А.А., Заикин А.Н. Сложные режимы распространения возбуждения и самоорганизации в модели свертывания крови. *Успехи физических наук*. 2007;177(1):87-104.
7. Ataullakhanov FI, Dashkevich NM, Negrier C, Pantelev MA. Factor XI and traveling waves: the key to understanding coagulation in hemophilia? *Expert Rev Hematol*. 2013 Apr;6(2):111-3.
8. Dashkevich NM, Ovanesov MV, Balandina AN, Karamzin SS, Shestakov PI, Soshitova NP, Tokarev AA, Pantelev MA, Ataullakhanov FI. Thrombin activity propagates in space during blood coagulation as an excitation wave. *Biophys J*. 2012 Nov 21;103(10):2233-40.