

Заключение.

В работе предложен алгоритм, позволяющий количественно оценивать взаимную суперспирализацию двух альфаспиралей, определять направление вращения суперспирали и степень ее закрутки. Дальнейшее развитие работы может быть направлено на анализ соответствия допустимых зон конформаций в значениях хиральности суперспиралей их функциям.

Возможно также продолжение развития подхода в рамках биомеханики для описания белковых структур как винтовых пружин и стержней с целью расчетов сил, крутящих и изгибающих моментов.

В молекулярных машинах, осуществляющих энергопреобразующие процессы, имеет смысл количественно оценить сопряженное действие поступательных и вращательных степеней свободы на основе анализа спиральных структур разного иерархического уровня.

Список литературы / References:

1. Шмутцер Э. *Симметрии и законы сохранения в физике*. М.: Мир, 1974, 159 с. [Schmutzter E. *Symmetries and conservation laws in physics*. М.: Mir, 1974, 159 p. (In Russ.)]
2. Урманцев Ю.А. *Симметрия природы и природа симметрии*. М.: Комкнига, 2007, 232 с. [Urmantsev Yu.A. *Symmetry of nature and the nature of symmetry*. М.: Komkniga, 2007, 232 p. (In Russ.)]
3. Заренков Н.А. *Биосимметрия*. М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2009, 320 с. [Zarenkov N.A. *Biosymmetric*. М.: Knizhny dom «LIBROKOM», 2009, 320 p. (In Russ.)]
4. Белоусов Л.В. *Симметричные преобразования в развитии организмов. Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии: симметрия и асимметрия*. Серия «Геобиологические системы в прошлом». М.: ПИН РАН, 2013, с. 6-21. [Belousov L.V. *Symmetry transformations in the development of organisms. Morphogenesis in individual and historical development: symmetry and asymmetry*. Part «Geobiological systems in the past». М.: PIN Russian Academy of Sciences, 2013, pp. 6-21. (In Russ.)]
5. Твердислов В.А., Сидорова А.Э., Яковенко Л.В. *Биофизическая экология*. М.: URSS, КРАСАНД, 2012, 544 с. [Tverdislov V.A., Sidorova A.E., Yakovenko L.V. *Biophysical ecology*. М.: URSS, KRASAND, 2012, 544 p. (In Russ.)]
6. Georges H. Wagnière. *On Chirality and the Universal Asymmetry*. © Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, 2007, 247 p.

МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ МИКРОВЕЗИКУЛ НА СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ

Филькова А.А., Липец Е.Н., Атауллаханов Ф.И.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

ул. Ленинские горы, 1, г. Москва, 119234, РФ

e-mail: aleksa0771@rambler.ru

Аннотация. Для многих патологических состояний показано, что микровезикулы являются одним из факторов гиперкоагуляции. Однако не ясно, за счет каких механизмов они влияют на свертываемость. Микровезикулы способны предоставлять фосфолипидную поверхность для сборки комплексов факторов свертывания, необходимых для распространения свертывания в пространстве. Также микровезикулы способны инициировать свертывание по контактному пути. Влияние на фазу распространения и фазу инициации могут оказывать и тромбоциты. Вопрос об активности естественных микровезикул, циркулирующих в плазме, на фоне тромбоцитов ранее не выяснялся. Для изучения фазы распространения в тесте генерации тромбина свертывание активировалось XIa фактором, данная постановка позволяла выделить вклад тромбоцитов и МВ только как поверхности для сборки комплексов. Прямая проверка влияния высоких концентраций МВ на распространение свертывания производилась в гетерогенном тесте Тромбодинамика-4D. Для оценки работы микровезикул в качестве активаторов свертывания в тесте генерации тромбина их добавляли в плазму вместе с избытком искусственных фосфолипидных везикул без дополнительного активатора. В тесте Тромбодинамика-4D вклад в фазу инициации определялся по времени начала образования спонтанных сгустков и по количеству их центров образования. Было показано, что микровезикулы в нормальной концентрации на фоне физиологической концентрации тромбоцитов не вносят существенного вклада в фазу распространения. При повышении концентрации микровезикул в результате патологии в 10 и более раз их роль как поверхности для сборки комплексов остается незначительной, но активация от микровезикул может приводить к появлению новых центров свертывания за времена порядка десятков минут.

Ключевые слова: микровезикулы, гиперкоагуляция, контактная активация, тромбоциты.

THE MECHANISM OF MICROPARTICLES EFFECT ON THE BLOOD COAGULATION

Filkova A.A., Lipets E.N., Ataulakhanov F.I.

Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia

e-mail: aleksa0771@rambler.ru

Abstract. For many pathological states it is shown that microparticles are one of the hypercoagulation factors. However it isn't clear for what mechanisms they influence on coagulation. Microparticles are able to provide a phospholipid surface for an assembly of complexes of the factors of coagulation necessary for propagation of coagulation in space. Also microparticles are able to initiate coagulation by a contact activation pathway. Platelets also can influence on a phase of propagation and a phase of initiation. The question of the activity of the natural microparticles circulating in plasma against the background of platelets wasn't investigated earlier. For the assessment of the phase of propagation in the test of thrombin generation coagulation was activated by XIa factor, this statement allowed to allocate a contribution of platelets and MP only as surfaces for the assembly of complexes. Direct check of the influence of high concentrations of MP on coagulation propagation was made in the heterogeneous Thrombodynamics-4D test. For assessment of the work of microparticles as activators of coagulation in the test of thrombin generation they were added to plasma together with excess of artificial phospholipid vesicles without an additional activator. In the Thrombodynamics-4D test the contribution to the phase of initiation was determined by the time of the beginning of formation of spontaneous clots and by the amount of their centers of formation. It was shown that microparticles in normal concentration against the background of physiological concentration of platelets don't make a significant contribution to a phase of propagation. With increasing concentration of microparticles in 10 and more times as a result of pathology their role as surfaces for the assembly of complexes remains insignificant, but the activation from microparticles can bring to formation of the new centers of coagulation for the times about ten minutes.

Key words: microparticles, hypercoagulation, the contact activation pathway, platelets.

Проведено множество исследований, в которых показано, что при таких заболеваниях, как диабет, острый коронарный синдром, менингококковый сепсис, тромбоцитопеническая пурпура, в крови значительно повышается концентрация МВ. В то же время у пациентов с перечисленными заболеваниями наблюдаются нарушения системы свертывания. Считается, что прокоагулянтные свойства микровезикул вызваны, в первую очередь, активацией свертывания через тканевый фактор на их поверхности и ускорением свертывания за счет фосфатидилсерина. Также при различных патологиях микровезикулы могут вызывать контактную активацию [1-3]. Способностью ускорять реакции свертывания и активировать плазму по контактному пути обладают также тромбоциты. Вопрос, насколько существенна фосфолипидная поверхность микровезикул и активация от них на фоне физиологической концентрации тромбоцитов, до сегодняшнего дня оставался нерассмотренным. В данной работе произведена оценка значимости микровезикул как поверхности для сборки комплексов и как активаторов свертывания на фоне тромбоцитов.

В исследовании [4] было показано, что поверхность микровезикул, выделенных из тромбоцитов при активации Са-ионофором, в 50 и 100 раз более прокоагулянтна по сравнению с поверхностью активированных тромбоцитов. Однако не ясно, за счет каких механизмов эта активность осуществляется, в какую фазу свертывания МВ вносят основной вклад, какова активность естественных МВ, циркулирующих в плазме по сравнению с тромбоцитами.

Процесс свертывания можно условно разбить на три стадии: инициации, распространения и остановки. Инициацию свертывания МВ способны запускать по внешнему пути. Так как в мембране МВ, образованных от моноцитов, наблюдается тканевый фактор – основной физиологический активатор свертывания. Также тромбоцитарные, эритроцитарные и, возможно, некоторые другие типы МВ способны запускать фазу инициации по внутреннему (контактному) пути.

Распространение свертывания в пространстве происходит в результате работы положительных обратных связей, приводящих к образованию фибринового сгустка вдали от активатора. Ключевыми участниками двух других положительных обратных связей являются белковые комплексы, собирающиеся на фосфолипидной поверхности. Естественной поверхностью для сборки комплексов в месте повреждения сосуда является поверхность активированных тромбоцитов, но эту функцию могут выполнять и МВ. Одна из необходимых положительных обратных связей - активация тромбином XI фактора.

В работе использовались два основных метода: гомогенный тест генерации тромбина и гетерогенный тест Тромбодинамика-4D. В обоих методах в плазму был добавлен субстрат, от которого при распространении свертывания тромбином отщеплялась флуоресцентная метка. В экспериментах снималась зависимость флуоресценции от времени, из которой рассчитывается зависимость тромбина от времени концентрации. В тесте генерации тромбина активатор равномерно перемешивается с плазмой. Метод Тромбодинамика-4D позволяет непосредственно наблюдать распространение сгустка в пространстве. В данном методе активация осуществляется от ТФ, локализованного на поверхности.

Для изучения фазы распространения в тесте генерации тромбина свертывание активировалось XIa фактором. Данная постановка позволяет выделить вклад тромбоцитов и МВ только как поверхности для сборки комплексов. Вклад контактной активации от МВ и тромбоцитов скрывается за счет добавления избытка внешнего fXIa. Свертывание активировалось фактором XIa, что соответствует физиологическому началу фазы

распространения, это запускало образование самоподдерживающейся волны тромбина. В момент начала фазы распространения тромбоциты частично активированы, поэтому вклад микровезикул непосредственно сравнивался с вкладом от активированных тромбоцитов.



Рисунок 1 – Зависимость пика концентрации тромбина от добавления физиологической концентрации тромбоцитов, микровезикул в нормальной концентрации, и превышающей нормальную в 8 раз. Контрольным образцом являлась плазма без добавления тромбоцитов и везикул

В гомогенном тесте генерации тромбина активность МВ в качестве фосфолипидной поверхности в концентрации, превышающей нормальную в 8 раз, может достигать ~30% активности тромбоцитов в физиологической концентрации (см. рис. 1). Можно предположить, что в такой концентрации МВ могут вносить существенный вклад в распространение свертывания. С другой стороны, параметры теста генерации тромбина при высокой концентрации активатора и физиологической концентрации тромбоцитов находятся в насыщении.

Для оценки вклада повышенных концентраций микровезикул в свертывание на фоне тромбоцитов, МВ добавлялись в плазму с тромбоцитами. Добавление МВ к тромбоцитам не влияет на максимальную концентрацию тромбина (см. рис. 2).

Прямая проверка влияния высоких концентраций МВ на распространение свертывания на фоне физиологической концентрации тромбоцитов также проводилась методом пространственной генерации тромбина (ТД4Д). В данном методе активация осуществляется от ТФ, локализованного на поверхности. Хотя в этом случае влияние на скорость распространения может оказывать как фосфолипидная поверхность, так и контактная активация от тромбоцитов и МВ, метод позволяет непосредственно наблюдать распространение сгустка в пространстве в более естественных условиях. Для оценки вклада микровезикул на фоне тромбоцитов в тест ТД4Д добавлялись неактивированные тромбоциты, так как это соответствует физиологическим условиям активации свертывания по внешнему пути тканевым фактором.

Микровезикулы в повышенной концентрации не дают вклада в систему свертывания на фоне тромбоцитов в физиологической концентрации в пространственно неоднородной системе (см. рис. 3).

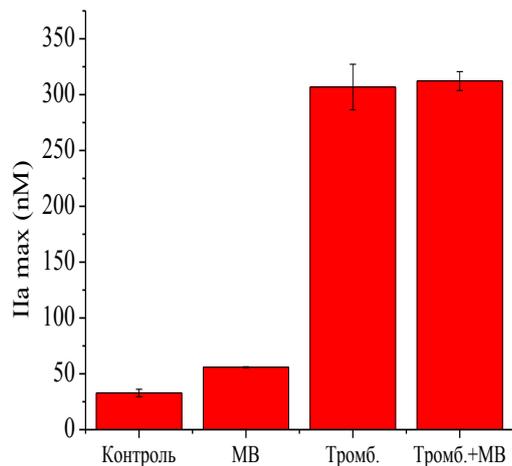


Рисунок 2 – Пик концентрации тромбина при добавлении тромбоцитов/микровезикул в плазму. Активация фактором XIa по внутреннему пути. Микровезикулы добавлялись в концентрации, в 10 раз превышающую норму. Активированные тромбоциты – в концентрации 150 тыс /1 мкл

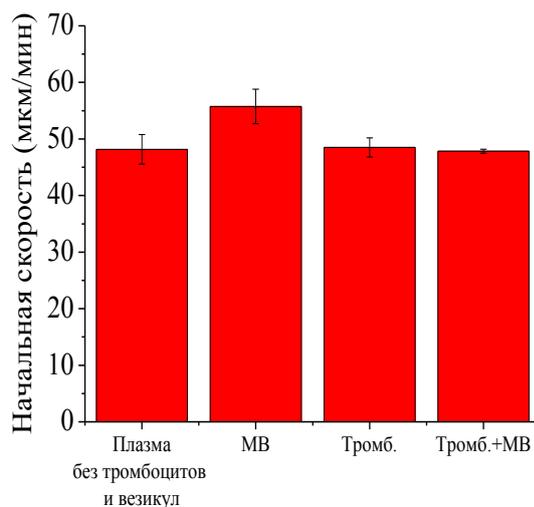


Рисунок 3 – Начальная скорость при добавлении тромбоцитов/микровезикул в плазму. Активация ТФ по внешнему пути. Микровезикулы добавлялись в концентрации, в 6,25 раз превышающую норму. Неактивированные тромбоциты – в концентрации 130 тыс /1 мкл.

Для оценки работы микровезикул в качестве активаторов свертывания в гомогенном тесте генерации тромбина их добавляли в ту же плазму вместе с избытком искусственных фосфолипидных везикул без дополнительного активатора. Фосфолипиды в избыточной концентрации дополнительно добавлялись для того, чтобы убрать из рассмотрения вклад микровезикул как поверхности для сборки комплексов. Контактная активация от микровезикул приводит к свертыванию за 30-45 минут, что несущественно при активации от ТФ при повреждении сосуда, но может быть важным при патологическом тромбообразовании (см. рис. 4).

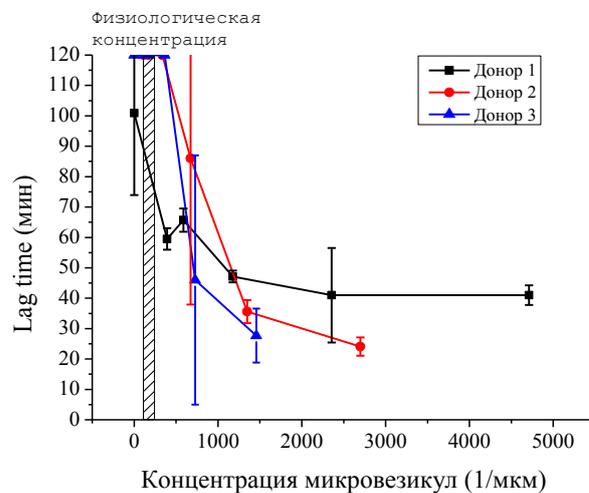


Рисунок 4 – Зависимость лаг-тайма от концентрации микровезикул в тесте генерации тромбина. В плазму добавлены фосфолипиды (12 мкМ). Кривые соответствуют трём разным донорам

В пространственно неоднородной постановке вклад MB в фазу инициации определялся по времени образования спонтанных сгустков (см. рис. 5).

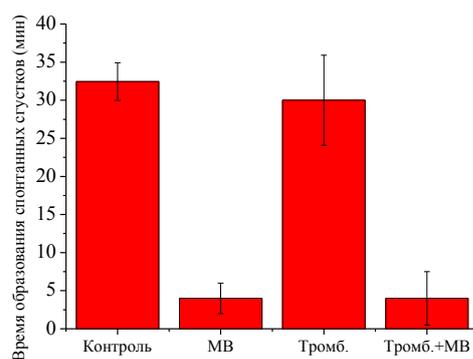


Рисунок 5 – Время начала образования спонтанных сгустков при добавлении неактивированных тромбоцитов или микровезикул в ТД4Д. Микровезикулы добавлялись в концентрации, в 6,25 раз превышающую норму. Неактивированные тромбоциты – в концентрации 130 тыс / 1 мкл

Также определялось количество центров образования спонтанных сгустков. В плазме с добавлением микровезикул и тромбоцитов наблюдается наибольшее количество центров образования.

Вклад микровезикул в распространение свертывания оказывается незначительным на фоне активированных тромбоцитов в физиологической концентрации *in vitro*.

В результате контактной активации от микровезикул увеличивается количество центров тромбообразования, свертывание инициируется за 30-45 минут, это может быть важным при патологическом тромбообразовании.

Список литературы / References:

1. Mallat Z., Benamer H., Hugel B., Benessiano J., Steg P.G., Freyssinet J.M., Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 2000, vol. 101, pp. 841-843
2. Nieuwland R., Berckmans R.J., McGregor S., Boing A.N., Romijn F.P., Westendorp R.G., Hack C.E., Sturk A. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*, 2000, vol. 95, pp. 930-935.
3. Kahn I.Z.-F.D., Karpatkin S. Microthrombocytosis and platelet fragmentation associated with idiopathic / autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.*, 1975, vol. 31, pp 449-60.
4. Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y., Pichugin A.V., Panteleev M.A., Krymskaya O.V., Ataullakhanov F.I. *Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets.* 2007, Schattauer GmbH, Stuttgart.