**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки**

**Центр теоретических проблем Физико-химической фармакологии**

**Российской академии наук**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| УДК: 577.3:61/63  Регистрационный № 01201266928  Инв. № 0131-2015-0001 |  | УТВЕРЖДАЮ  Директор  \_\_\_\_\_\_\_\_\_Ф.И. Атауллаханов  «\_\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2016 г. |

М.П.

**Отчет о результатах исследований**

**по программе Президиума РАН**

**«Интегративная физиология»**

**Название проекта: Пространственно-временное распределение тромбина в цельной крови как новый метод исследования физиологии свертывания.**

Руководитель проекта \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ **/**Ф.И. Атауллаханов **/**

подпись расшифровка

Москва 2016

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, член-корр. РАН, д.б.н. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Атауллаханов Ф.И.

подпись, дата

ст.н.с., к.б.н. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Липец Е.Н.

подпись, дата

н.с. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Колядко В.Н.

подпись, дата

ст.н.с., к.б.н. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Баландина А.Н.

подпись, дата

вед.н.с., к.б.н. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Шибеко А.М.

подпись, дата

**Реферат**

Отчет 11 стр., 1 ч., 4 рис., 6 источников.

Ключевые слова: свертывание крови, тромбин, пространственное распределение факторов свертывания, математическое моделирование.

Цель исследования – разработка методики регистрации пространственно-временного распределения тромбина в цельной крови.

На данном этапе исследований использовались компьютерные симуляции отдельных этапов свертывания в цельной крови, что позволило лучше понять механизмы, управляющие гемостазом. При помощи математического моделирования было исследовано влияние деградации фактора Vа в нерекльцифицированной и рекальцифицированной крови.

Показано, что за время эксперимента деградацией фактор Va можно пренебречь. Также было продемонстрировано, что экспериментально обнаруженное уменьшение на 3 порядка коэффициента диффузии фактора Ха в тромбоцитраном тромбе объясняется его связыванием с фосфолипидами на тромбоцитах. Имеющиеся на тромбоцитах высокоафинные сайты связывания фактора Ха (фактор Va) и низкоафинные сайты (фосфолипиды) имеют примерно одинаковую эффективность связывания фактора Ха с учетом их концентрации, но низкоафинные сайты могут быть в большей части заняты протромбином. Подобный эффект может наблюдаться и для фактора IXa, который также имеет высокоафинные сайты (фактор VIIIa) и низкоафинные сайты (фосфолипиды) связывания на тромбоцитах.

Таким образом, диффузия факторов в тромбоцитарном тромбе существенным образом отличается от диффузии факторов в фибриновом сгустке, и дальнейшее исследование этого процесса необходимо для понимания физических процессов, приводящих к формированию пространственно-временного распределения тромбина в цельной крови.

Содержание

[Введение 5](#_Toc473292122)

[Основная часть 6](#_Toc473292123)

[1. Оценка влияния диссоциации фактора Va в цельной крови на генерацию тромбина 6](#_Toc473292124)

[2. Оценка влияния диффузии фактора Ха в цельной крови на генерацию тромбина 8](#_Toc473292125)

[Выводы 10](#_Toc473292126)

[Список использованных источников 11](#_Toc473292127)

## Введение

Регистрация протекания свертывания в цельной крови связана с рядом особенностей, отсутствующих в случае, когда свертывание исследуется в плазме крови. Наличие эритроцитов делает среду оптически непрозрачной, а присутствующие в образце тромбоциты могут агрегировать, образуя сгусток, распределение тромбина в котором может отличаться от распределения в фибриновом сгустке.

Тромбин является основным регулятором системы свертывания крови, отвечающим не только за превращение фибриногена в плотный сгусток и активацию тромбоцитов, но и участвующим как в реакциях, приводящих к ускорению свертывания, таких как активация факторов V, VIII, так и в реакциях, приводящих к подавлению свертывания – активации протеина С. Основным активатором тромбина является комплекс факторов Ха и Va (XaVa) – протромбиназа. Поэтому распределение факторов Va и Ха будет являться определяющим для генерации тромбина.

Фактор V после активации представляет собой комплекс, состоящий из двух субъединиц, тяжелой (105 кДа) и легкой (74 кДа) цепей (Esmon, JBC 1979). Эти цепи могут диссоциировать, и фактор Va теряет свою активность, однако в присутствии ионов кальция может происходить реассоциация, и фактор Va восстанавливает свою активность (Nesheim & Mann, JBC 1979). Так как эксперимент по регистрации распределения тромбина в цельной крови может идти до полутора часов, необходимо выяснить, будет ли деградация фактора Va за время эксперимента сказываться на его результатах.

Формирование тромбоцитарного сгустка в цельной крови может привести к тому, что распределение фактора Ха будет сильно изменено по сравнению со свертыванием в плазме крови: диффузия фактора Ха в тромбоцитарном сгустке протекает почти в 1000 раз медленнее (Hathcock & Nemerson, Blood 2004). Понимание механизмов регуляции распределения фактора Ха в тромбоцитарном сгустке необходимо для создания модели, описывающей генерацию тромбина в цельной крови.

Цель данного этапа – при помощи математического моделирования сформировать понимание механизмов, регулирующих распределение тромбина в тромбоцитарном сгустке.

## Основная часть

### Оценка влияния диссоциации фактора Va в цельной крови на генерацию тромбина

Для оценки влияния диссоциации фактора Va в цельной крови мы разработали математическую модель его деградации. Как ранее было показано (Koppaka et al, Biophys J 1997), легкая цепь фактора Va связывается с фосфолипидами в присутствии ионов кальция с константой диссоциации 10 нМ. Тяжелая цепь фактора Va связывается с фосфолипидами независимо от присутствия ионов кальция с константой диссоциации 300 нМ. При этом, диссоциация тяжелой и легкой цепи происходит со скоростью 1.73\*10-5 с-1, а реассоциация в присутствии ионов кальция происходит со скоростью 2.5 м3/(моль\*с) (Krishnaswamy et al, JBC 1989). В нашей модели мы рассматривали следующие реакции:

1. Диссоциация фактора на тяжелую и легкую цепи :Va<->LC+HC – обратимая(есть Са2+)/необратимая(нет Са2+)
2. Связывания фактора с фосфолипидами на тромбоцитах: FVa<->FVaB – обратимое связывание с липидами (Kd=300nM без Ca2+, Kd=10nM с Са2+)
3. Диссоциация связанного с фосфолипидами фактора на тяжелую и легкую цепи FVaB<->HC(B)+LC(B) – обратимая(есть Са2+)/необратимая(нет Са2+). При этом в отсутствии кальция связанной с фосфолипидами остается тяжелая цепь, а в присутствии кальция – легкая.

В работе (Gale et al, Pharm Res 2016) была измерена скорость деградации фактора Va в нерекальцифицированной цельной крови (рис.1). Мы использовали эту работу для калибровки нашей модели деградации фактора Va (рис.2).

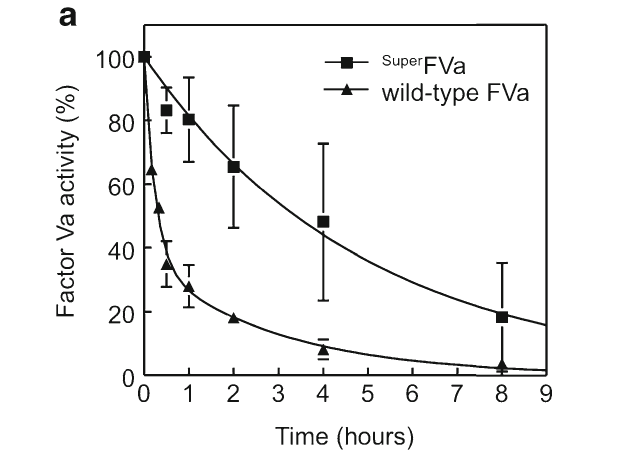


Рис.1. Активность фактора Va в нерекальцифицированной крови, измеренная при помощи АЧТВ. Рисунок воспроизведен из (Gale et al, Pharm Res 2016). Треульники –фактор Va дикого типа.



Рис.2. Сравнение экспериментальных данных работы (Gale et al, Pharm Res 2016) и результатов моделирования. Зеленым показана симуляция деградации фактора Va в отсутствии ионов кальция, красным – в присутствии.

В ходе моделирования мы выяснили, что падение активности фактора Va в нерекальцифицированной крови описывается двухэкспоненциальной кинетикой. Это означает, что фактор Va, связанный с фосфолипидами, диссоциирует медленнее, чем свободный. Константа диссоциации свободного фактора Va у нас получилась равной 8.6\*10-4 с-1, а константа диссоциации связанного с липидами фактора Va – равной 5.16\*10-5 с-1. При этом, без кальция за полтора часа активность фактора Va падает до 23% от начально, а в присутствии кальция – до 70%. Таким образом, деградацией фактора Va за время проведения эксперимента можно пренебречь.

### Оценка влияния диффузии фактора Ха в цельной крови на генерацию тромбина

В работе (Hathcock & Nemerson, Blood 2004) было продемонстрировано, что эффективный коэффициент диффузии фактора Ха в тромбоцитарном тромбе уменьшается почти в 1000 раз по сравнению с коэффициентом диффузии в фибриновом тромбе. Мы разработали модель диффузии фактора Ха в присутствии и отсутствии тромбоцитов для того, чтобы разобраться в механизмах, вызывающих такое ухудшение диффузии.

Фактор Ха мог связываться с фосфолипидами на поверхности тромбоцитов с константой диссоциации 70 нМ (Podoplelova et al, BBA 2016). Связанный фактор не мог диффундировать, а свободный – диффундировал со своим обычным коэффициентом диффузии.



Рис.3. Диффузные профили фактора Ха в присутствии и отсутствии тромбоцитов через 105 секунд после начала симуляции. Изначально фактор Ха находился только в точке x=0. Вариант 1 (черный) – в системе имеются тромбоциты, с которыми фактор Ха может связываться. Вариант 2 (красный) – в системе нет тромбоцитов, но коэффициент диффузии фактора Ха уменьшен на 3 порядка.

Из результатов моделирования (рис.3) мы видим, что простое связывание фактора Ха с фосфолипидами тромбоцитов приводит к уменьшению эффективного коэффициента диффузии фактора Ха на 3 порядка. Однако в крови имеются конкуренты фактора Ха за места на фосфолипидах тромбоцитов. Основной из них – протромбин. Он может связываться с фосфолипидами тромбоцитов с константой диссоциации 13 нМ, а его концентрация 1400нМ. Таким образом, в присутствии протромбина диффузия фактора Ха в тромбоцитарном тромбе ухудшается примерно на 35% (рис.4).



Рис.4. Диффузные профили фактора Ха в присутствии и отсутствии тромбоцитов и протромбина через 103 секунд после начала симуляции. Черным показан случай, когда в системе есть и тромбоциты, и протромбин. Красным – когда только тромбоциты. Зеленым – когда нет тромбоцитов. Синим – когда нет тромбоцитов, но коэффициент диффузии фактора Ха составляет 65% от коэффициента диффузии свободного фактора Ха.

Таким образом, протромбин занимает практически все низкоафинные сайты связывания фактора Ха на тромбоцитах, что делает уменьшение диффузии фактора Ха через тромбоцитарный тромб пренебрежимо малым. Однако, на тромбоцитах присутствуют высокоафинные сайты связывания фактора Ха (фактор Va), которым не связывают протромбин. Если оценить сверху количество низкоафинных сайтов связывания в тромбе (50мкМ) и константу диссоциации (70 нМ) и концентрацию высокоафинных сайтов (100 нМ) и константу диссоциации (0.14 нМ), то получается, что эффективность связывания высоко и низкоафинных сайтов с фактором Ха будет примерно одинаковой. Однако сами высокоафинные сайты связываются с тромбоцитами конкурентно с протромбином, и их реальная концентрация может быть сильно ниже.

## Выводы

В результате текущих исследований мы установили, следующие особенности механизмов, управляющих генерацией тромбина в цельной крови. Мы показали, что деградацией фактора Va, компонента протромбиназы – основного активатора тромбина, можно пренебречь на характерных временах эксперимента.

Мы выяснили, что в тромбоцитарном тромбе диффузия фактора Ха ухудшается из-за его связывания с фосфолипидами на поверхности тромбоцитов, однако этот процесс регулируется присутствующем в системе протромбином.

Для дальнейших исследований необходимо построение более детальной модели диффузии фактора Ха в тромбоцитарном тромбе, учитывающей не только связывание с высокоафинными сайтами, но и связывание самих сайтов с тромбоцитами и влияние протромбина на этот процесс. Также необходимо учесть, что схожие механизмы работают и для фактора IXa, которым может связываться как с фосфолипидами, так и с фактором VIIIa. При этом образуемый им комплекс IXaVIIIa является одним из основных активаторов фактора Ха. Поэтому разработка модели диффузии фактора IXa в тромбоцитарном тромбе также необходима для понимания процесса формирования тромбина в цельной крови.

## Список использованных источников

1. Esmon CT. The subunit structure of thrombin-activated factor V. Isolation of activated factor V, separation of subunits, and reconstitution of biological activity. J. Biol. Chem. 254, 964-973.
2. Nesheim ME and Mann KG. Thrombin-catalyzed activation of single chain bovine factor V. J. Biol. Chem. 1979 254: 1326-34.
3. Hathcock JJ and Nemerson Y. Platelet deposition inhibits tissue factor activity: in vitro clots are impermeable to factor Xa. Blood. 2004 Jul 1;104(1):123-7.
4. Koppaka V, Talbot WF, Zhai X, Lentz BR. Roles of factor Va heavy and light chains in protein and lipid rearrangements associated with the formation of a bovine factor Va-membrane complex. Biophys J. 1997 Nov;73(5):2638-52.
5. Krishnaswamy S, Russell GD and Mann KG. The reassociation of factor Va from its isolated subunits. The J. Biol. Chem. 264, 3160-3168.
6. Podoplelova NA, Sveshnikova AN, Kurasawa JH, Sarafanov AG, Chambost H, Vasil'ev SA, Demina IA, Ataullakhanov FI, Alessi MC, Panteleev MA. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to procoagulant activated platelets and phospholipids results from multistep association and membrane-dependent multimerization. Biochim Biophys Acta. 2016 Jun;1858(6):1216-27.