ВВЕДЕНИЕ

Свертывание крови является важнейшим этапом работы гомеостаза в организме человека. Оно представляет собой систему сложных реакций, проходящих в плазме крови при повреждении стенки сосуда. Задачей свертывания крови является закупорка поврежденного места сосуда посредством образования тромба или фибринового сгустка, тем сам предотвращая кровоизлияние и потерю крови. В артериальных сосудах, где кровь течет под большим давлением, образуются тромбы - кровяные сгустки, которые образуются в результате активации системы свертывания крови. Важно отметить, что тромбы из-за своей плотной структуры перекрывают движение форменных элементам, таким как эритроциты (несущие кислород), лейкоциты и тромбоциты. В венозных сосудах чаще образуются фибриновые сгустки - сгустки, образующиеся из фибриногена и представляющие собой желейную массу. Важным отличием фибриновых сгустков от тромбов является способность пропускать форменные элементы.

В медицине встречаются патологии (например, синдром Скотта) в свертывании крови, связанные с нарушением его тромбоцитарного звена из-за недостатка или полного отсутствия фосфатидилсерин положительных тромбоцитов. В норме фосфатидилсерин - компонент фосфолипидных мембран клеток - находится во внутренней ее части. Однако при получении сигнала (в случае свертывания крови) или при апоптозе клетки, фосфатидилсерин переходит на внешнюю сторону плазматической мембраны тромбоцита и образуется тромб. Фосфатидилсерин положительные тромбоциты были открыты в начале 2000 годов и только несколько лет назад стало понятно, как тромбоциты «решают» стать фосфатидилсерин-положительными или отрицательными. Их роль в образовании тромба до конца остается неизученной, но на данный момент известно, что:

1. фосфатидилсерин положительные тромбоциты участвуют в образовании тромба в тромбоцитарном звене свертывания крови
2. они также участвуют в плазменном звене свертывания крови, ибо на них образуется фибриновый сгусток. При недостатке фосфатидилсерин положительных тромбоцитов рецепиенту переливают тромбоцитарную массу.

 Учеными было открыто связывание фосфатидилсерина в присутствии ионов кальция с белком Аннексином V, который в малых количествах находится у нас в организме. Аннексин V - кальцезависимый белок семейста аннексинов. Его биологическая роль в организме мало изучена, однако, его широко применяют в лаборатории для изучения его взаимодействия с фосфолипидными мембранами. Это исследование очень важно, так как определение количества фосфатидилсерин положительных тромбоцитов может помочь больным с нарушением тромбоцитарного звена свертывания крови. К сожалению, болезни с такими нарушениями не лечатся из-за своего мутагенного происхождения, но вовремя выявленная болезнь может облегчить жизнь больным, так как они будут находиться под контролем врачей.

В предложенной работе исследуется взаимодействие белка Аннексина V с фосфолипидными мембранами. В ходе теоретической части исследования будут рассмотрены механизмы тромбоцитарного звена свертывания крови, представлены болезни, связанные с нарушениями работы данного звена. Большой вклад в изучение механизмов свертывания крови внесли наши соотечественники - Пантелеев М. А. и Атауллаханов Ф. И. В серии научно-популярного журнала «ОНКОгематология» подробно описан механизм свертывания крови и рассмотрены его возможные нарушения. Также будет исследован материал о белке Аннексине V на основе научно-популярных статей иностранных ученых Волкер Герке и Стефана Мосса: изучение его строения, функций и взаимодействия с фосфолипидными мембранами. К сожалению, на данный момент аннексины являются плохо изученными белками и их биологическая роль в организме человека до сих пор исследуется, поэтому для изучения семейства аннексиновых белков я обращаюсь к статьям заружебных ученых. В ходе практической части исследования будет изучено взаимодействие Аннексина V с фосфолипидными везикулами - с фосфатидилсерином и фостадилихолином. Уже доказано, что Аннексин V связывается именно с фосфатидилсерином, но данное фосфоорганическое соединение в фосфолипидных мембранах находится не по одиночке, поэтому для исследования связывания берутся везикулы фосфатидилсерина вместе с везикулами фосфатидилхолина. Результатом экспериментов должны стать полученные в самих экспериментах и выявленные в ходе математического анализа кинетические константы диссоциации и ассоциации и равновесная константа. Выявление кинетических констант и является целью данной работы. В исследовательской работе поставлены следующие задачи:

1. изучить и описать механизмы свертывания крови (прежде всего тромбоцитарное звено), рассмотреть возможные нарушения его работы
2. исследовать и описать биохимическую структура аннексина, изучить его функции и биогическую роль в организме
3. освоить метод проточной цитометрии
4. научиться с помощью него детектировать фосфолипидные везикулы
5. изучить зависимость количества связавшегося с везикулами аннексина V от концентрации добавленного
6. по данным зависимостям рассчитать равновесную константу
7. измерить кинетику связывания и диссоциации аннексина с фосфолипидными везикулами

рассчитать кинетические константы ассоциации и диссоциации