

© 1994 г. АТАУЛЛАХАНОВ Ф.И., ВОЛКОВА Р.И., ПОХИЛКО А.В., СИНАУРИДЗЕ Е.И.

ПОРОГОВОЕ ПОВЕДЕНИЕ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛЬЦИЯ

В работе исследовалась кинетика свертывания цитратной плазмы крови *in vitro* при добавлении различных концентраций кальция. Показано, что активация фактора XI не зависит от концентрации кальция, в то время как концентрация тромбина нелинейно нарастает при концентрации свободного кальция в диапазоне от 0,2 до 3 мМ. Кинетика образования тромбина хорошо аппроксимируется экспоненциальной зависимостью. Показатель экспоненты резко увеличивается в диапазоне концентраций свободного кальция от 0,2 до 0,5 мМ и выходит на плато при больших концентрациях кальция. При концентрациях свободного кальция ниже 0,2 мМ концентрация тромбина не нарастает и свертывание не происходит. Уровень тромбина при этом ниже чувствительности системы измерения (меньше 10 пкМ). Таким образом, система ведет себя пороговым образом при изменении концентрации кальция. Пороговая концентрация свободного кальция равна 0,2 мМ.

Система свертывания крови обладает рядом уникальных пространственно-динамических свойств, которые обеспечивают надежное выполнение жизненно важной физиологической задачи – защиту организма от последствий повреждения сосудистой стенки. При этом в зоне повреждения сосуда происходит быстрый переход крови в новое агрегатное состояние – образование твердого сгустка. Таким образом, для системы в целом характерна бистабильность (триггерное поведение), т.е. возможно ее существование в одном из двух устойчивых состояний – жидком или твердом.

Вне кровотока кровь быстро сворачивается, т.е. жидкое состояние крови оказывается неустойчивым. Причиной этого может быть сильная активация системы после взятия крови или отсутствие существенных для жидкого состояния компонентов системы (например, стенки сосуда).

Общая динамика системы свертывания была проанализирована и промоделирована в работах [1–3]. Основной вывод этих работ состоит в том, что современные биохимические представления позволяют получить математические модели системы свертывания, обладающие пороговым поведением.

В настоящей работе предпринята попытка экспериментального обнаружения пороговых свойств у системы свертывания вне кровотока. Задача осложняется тем, что после взятия крови *in vitro* происходит контактная активация этой системы, причем уровень ее всегда значительно выше порогового. Поэтому поставленный вопрос невозможно решить, исследуя кинетику этой системы *in vitro* при разных уровнях активации.

Обходной способ решения вопроса о наличии порогового поведения в системе свертывания связан с существованием в ней кальциевой регуляции. В соответствии с этим в работе была экспериментально исследована кинетика активации этой системы в неразбавленной свежей донорской плазме при различных концентрациях свободного кальция. Опыты проводились в условиях постоянной контактной активации. Ее величину оценивали, измеряя концентрацию фактора XIa в системе. Кинетику образования тромба лучше всего характеризует концентрация тромбина, которую измеряли в тех же опытах. Эксперимент подтвердил существование в подобной системе триггерного поведения в зависимости от уровня свободного кальция.

Качественный анализ динамики внутреннего и внешнего путей системы свертывания был проведен в работах Ханина и соавторов [1,2]. Хотя зависимость кинетики процесса от концентрации кальция в этих работах не исследовалась, не представляет труда ввести в данные модели представление о роли кальция. Из литературы известно, что кальций является обязательным компонентом двух активных комплексов, которые являются катализаторами активации фактора X и фактора II [4]. Таким образом, чтобы включить кальций в модели, надо предположить, что константы соответствующих реакций являются функциями концентрации кальция.

Рассмотрение моделей показывает, что влияние кальция качественно эквивалентно активирующему действию внешних сигналов, если мы рассматриваем ответ системы на уровне тромбина или фибрина. Активирующий фактор и константы скоростей реакций, зависящих от концентрации кальция, входят в решение в виде сомножителей единого обобщенного параметра активации. Это значит, что для каждого значения параметра активации существует своя пороговая концентрация кальция и наоборот. Так как концентрация кальция в системе *in vitro* легко измеряется и регулируется, это позволяет экспериментально исследовать вопрос о наличии порогового поведения в такой системе.

Материалы и методы. Все эксперименты были выполнены на обедненной тромбоцитами плазме, полученной из крови здоровых доноров, заготовленной в стандартные полимерные контейнеры с консервирующим цитратным раствором «Глюгизир», путем центрифугирования при 2400 г в течение 20 мин при комнатной температуре. Свертывание в такой системе остановлено тем, что большая часть кальция связана с цитратом. В такой плазме из-за контакта с чужеродной поверхностью должны быть активированы факторы контактной активации, но концентрации факторов Xa и IIa должны быть очень малы из-за малой концентрации свободного кальция.

В течение эксперимента плазма хранилась в стерильном полимерном контейнере при комнатной температуре. Свертывание запускалось добавлением раствора CaCl_2 .

Для стандартизации содержания коагуляционно-активной фосфолипидной поверхности в бедной плазме во все пробы добавлялся «Эрилид» – фосфолипидный препарат, выделяемый из мембран эритроцитов [5].

Для измерения концентрации фактора XIa использовался хромогенный п-нитроанилидный субстрат S2366 фирмы «Kabi Diagnostica». Концентрация тромбина измерялась с помощью специально синтезированного субстрата (S) Boc-Ala-Pro-Arg-AMC, где Boc – *t*-N-бутоксикарбонил-, а AMC – остаток 4-метил-7-аминокумарина. Особенностью данного субстрата является то, что продукт его расщепления (AMC) имеет высокий коэффициент экстинкции, что позволяет работать с ним и спектрофотометрически.

Концентрация ионов свободного кальция в пробах измерялась с помощью ионселективного кальциевого электрода фирмы «Orion».

Измерение кинетик образования активных факторов IIa и XIa проводилось до момента свертывания, под которым понималось время с момента добавления кальция в пробу до наматывания нитей фибрина на мешалку.

Флюориметрические измерения кинетики образования тромбина проводили на спектрофлуориметре фирмы «Joben-Ivon». Продукт реакции – аминотилкумарин (AMC) регистрировали при длине волны возбуждения 380 нм и длине волны испускания 440 нм. Флюоресценция регистрировалась в пристеночном слое кюветы, что позволяет резко уменьшить вклад светорассеяния образующегося в пробах сгустка в измеряемый сигнал. Контрольные пробы, не содержащие флюорогенного субстрата, показали, что при таком режиме регистрации светорассеяние не дает измеримого вклада во флюоресценцию.

Пробы содержали: «Эрилид» в конечной концентрации 0,6 мг/мл, субстрат S в конечной концентрации 50 мкМ и различные концентрации ионов кальция (от 0,15 до 3,4 мМ свободного кальция). Все добавки делались в буфере, содержащем 0,15 М трис-HCl; 0,1 М NaCl, имеющем pH 8,0. Общий объем

добавок во всех пробах составлял 17% по объему. Все измерения проводились при 37°C и постоянном перемешивании.

Для спектрофотометрической регистрации кинетики образования тромбина по оптической плотности измерения проводили на спектрофотометре фирмы «Апи́со» в двухволновом режиме на длинах волн 332 нм (изобестическая точка смеси S/AMC) и 340 нм (максимум поглощения продукта). Такой метод позволяет минимизировать вклад светорассеяния в измеряемый оптический сигнал. Условия измерения и концентрации реагентов аналогичны применяемым во флюориметрическом методе регистрации.

Фактор XIa измерялся спектрофотометрически в двухволновом режиме на спектрофотометре «Апи́со» с хромогенным субстратом S2366 в конечной концентрации 500 мкМ, по разности оптических плотностей на длинах волн 349 и 342 нм (изобестическая точка смеси субстрат/п-нитроанилид).

Применение описанных выше методик регистрации позволяет проводить измерения непосредственно в нативной плазме, где запущено свертывание и происходит существенное изменение светорассеяния в процессе реакции. Это выгодно отличает данные методики от большинства существующих, в которых из-за больших вкладов светорассеяния в регистрируемый сигнал требуется предварительное разбавление системы, чтобы избежать возможного свертывания.

Результаты и обсуждение. На рис.1,А изображена зависимость времени свертывания плазмы (Т) от концентрации свободного кальция в системе. Видно,

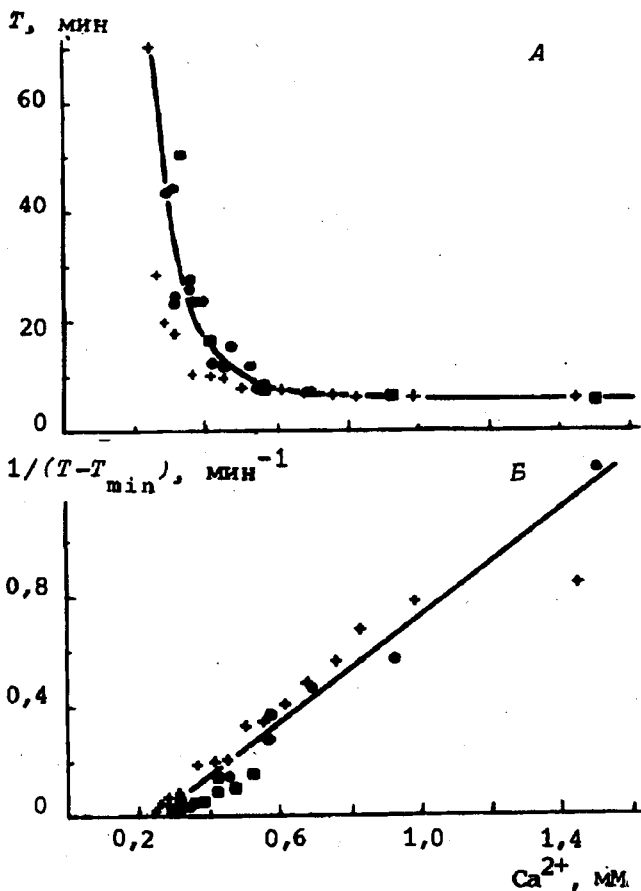


Рис.1. Зависимость времени свертывания плазмы (Т) от концентрации свободного кальция в системе (А). Зависимость обратного времени свертывания плазмы от концентрации свободного кальция в системе (Б). (Более подробно см. в разделе «Результаты и обсуждение»)

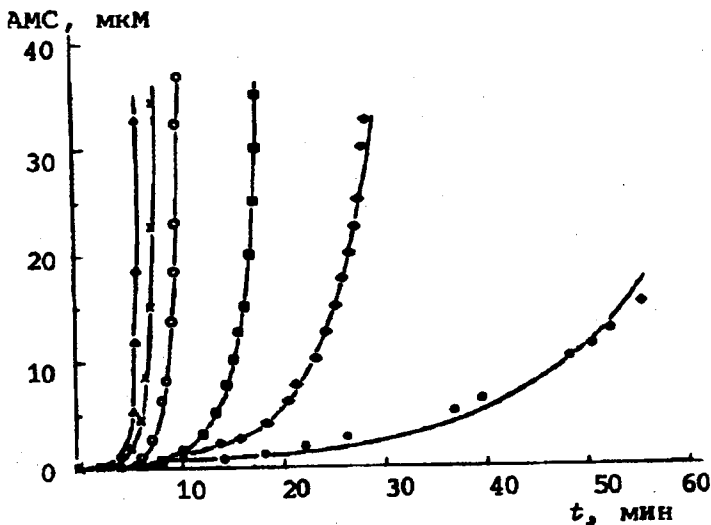


Рис.2. Кинетики накопления продукта гидролиза субстрата S в одной и той же плазме при различных концентрациях свободного кальция в системе (за вычетом фона). Использованы следующие концентрации свободного кальция: 1 — 0,24; 2 — 0,26; 3 — 0,31; 4 — 0,36; 5 — 0,50; 6 — 1,44 мМ. Результаты получены спектрофлуориметрически. Точки соответствуют экспериментальным данным. Линиями представлены экспоненциальные аппроксимационные кривые. (Детальное описание условий см. в разделе «Материалы и методы»)

что с ростом концентрации кальция время свертывания быстро уменьшается. Кривая в целом похожа на гиперболу, что подтверждает рис.1,Б, на котором приведена зависимость обратного времени свертывания от концентрации свободного кальция. При концентрации свободного кальция ниже 0,19 мМ время свертывания превышало предельное время эксперимента (70 мин). Похоже, что при концентрациях свободного кальция заметно ниже 0,19 мМ свертывания в системе вообще не происходит.

На рис.2 изображена кинетика расщепления тромбинового субстрата S при разных концентрациях кальция. Быстрый рост скорости расщепления на этих кривых соответствует началу свертывания. Видно, что момент нарастания концентрации тромбина сильно зависит от концентрации кальция.

Из приведенных кривых гидролиза субстрата S вычтена фоновая скорость его разложения в плазме.

В цитратной плазме всегда существует некоторая незначительная фоновая скорость расщепления субстрата S, которая не зависит от концентрации добавленного кальция. Эта скорость мало варьирует в разных плазмах и не изменяется в присутствии гирудина — специфического ингибитора тромбина, что подтверждает, что фоновое расщепление субстрата обусловлено не тромбином, а другими неспецифическими протеазами плазмы. Величина этой фоновой скорости не превышает 2–3% от максимальных скоростей разложения субстрата в условиях, когда свертывание происходит за время до 30 мин.

Кинетику активации фактора XI в плазме изучали с помощью измерения скоростей гидролиза хромогенного субстрата S2366, специфично расщепляемого фактором XIa. Так как этот субстрат достаточно быстро расщепляется и образующимся тромбином (константа скорости его гидролиза под действием тромбина примерно в 7 раз ниже, чем для гидролиза под действием фактора XIa), то все измерения с этим субстратом проводили только на начальных стадиях реакции, пока тромбин не начинает вносить свой вклад в гидролиз субстрата.

Стенки кварцевой измерительной кюветы постоянно активируют контактные факторы свертывающей системы, поэтому при помещении цитратной плазмы в

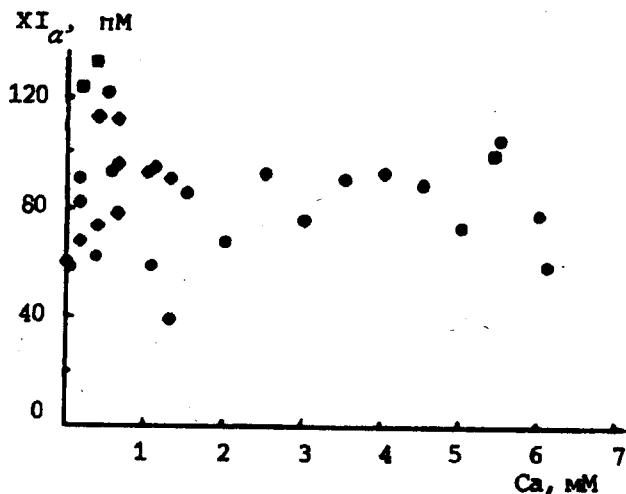


Рис.3. Зависимость начальных концентраций фактора XIa в плазме от концентрации свободного кальция в системе, измеренная спектрофотометрически по гидролизу S2366. Разные обозначения соответствуют различным образцам плазмы. (Условия измерений см. в разделе «Материалы и методы»)

кювету сразу же наблюдается расщепление S2366 со скоростями, лежащими для разных плазм в диапазоне 0,1–0,2 мМ/с. В течение опыта скорость расщепления этого субстрата слегка уменьшается. В пластиковой кювете скорость расщепления S2366 примерно в 2 раза меньше, чем в кварцевой, и тоже слегка уменьшается во времени. Картина не меняется при добавлении различных концентраций кальция до того момента, когда образовавшийся тромбин начинает вносить свой вклад в расщепление субстрата, т.е. на конечных стадиях образования сгустка.

На рис.3 изображена зависимость начальной концентрации фактора XIa от концентрации свободного кальция. Кинетика образования фактора XIa исследовалась с помощью субстрата S2366. Полученные результаты показывают, что активация фактора XI в измерительной кювете происходит очень быстро и уровень ее не зависит от концентрации кальция в системе, а только от материала кюветы. Значительный разброс результатов измерения активности фактора XIa от опыта к опыту обусловлен, по-видимому, различными исходными активирующими воздействиями на плазму, которые не контролировались. Однако именно они напрямую определяют активность фактора XIa в каждой исследуемой пробе. Никакой закономерности, определяющей этот разброс, найти не удалось.

Независимость активации фактора XIa от концентрации свободного кальция позволяет считать, что в наших опытах по изучению кинетики образования тромбина в одной и той же плазме в присутствии различных концентраций кальция, уровень исходной контактной активации внутреннего пути свертывающей системы во всех пробах одинаков.

Совершенно по-другому зависела от концентрации свободного кальция кинетика накопления тромбина в системе. Для количественной интерпретации полученных результатов первоначально кривые накопления продуктов гидролиза субстрата S были аппроксимированы экспоненциальной функцией. Данные этой аппроксимации приведены на рис.2 вместе с экспериментальными результатами. Видно хорошее совпадение с экспериментом.

Анализ экспериментально полученных экспоненциальных кривых образования тромбина показал, что показатель экспоненты («а») зависит от концентрации свободного кальция в системе. Эта зависимость приведена на рис.4. Видно, что имеется некоторая предельная (пороговая) концентрация кальция, ниже которой этот показатель равен 0. Это означает, что в этой зоне концентраций нет роста

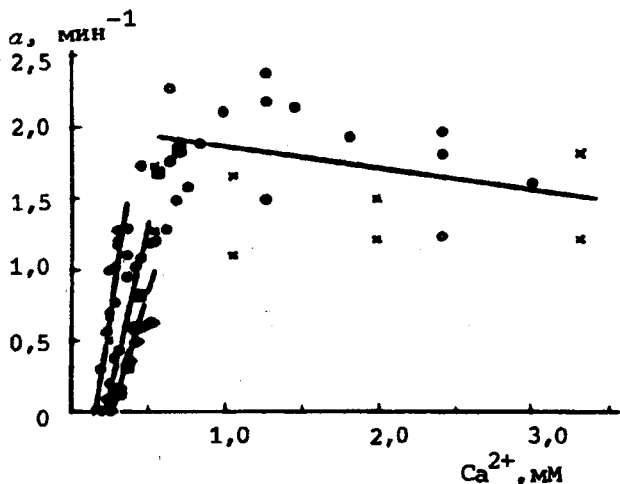


Рис.4. Зависимость показателя экспонент, аппроксимирующих кинетики расщепления в плазме специфического для тромбина субстрата («а»), от концентрации свободного кальция в системе. (Детали см. в разделе «Результаты и обсуждение»)

концентрации тромбина. Пороговая концентрация свободного кальция составляет 0,15–0,24 мМ и несколько варьирует для разных плазм. При увеличении концентрации кальция величина показателя «а» быстро растет и достигает своего предельного значения при концентрации свободного кальция выше 1 мМ. Довольно большая величина разброса в области больших концентраций кальция обусловлена, видимо, быстрым ростом погрешности аппроксимации при большой крутизне исходных кинетических кривых.

Вывод о наличии в свертывающей системе *in vitro* порога по концентрации кальция можно сделать и без аппроксимации экспериментальных кривых. Касательная к кривой накопления продукта на рис.2 в момент образования сгустка даст нам величину («b»), пропорциональную концентрации тромбина в этот момент. Зависимость этой величины от концентрации свободного кальция при-

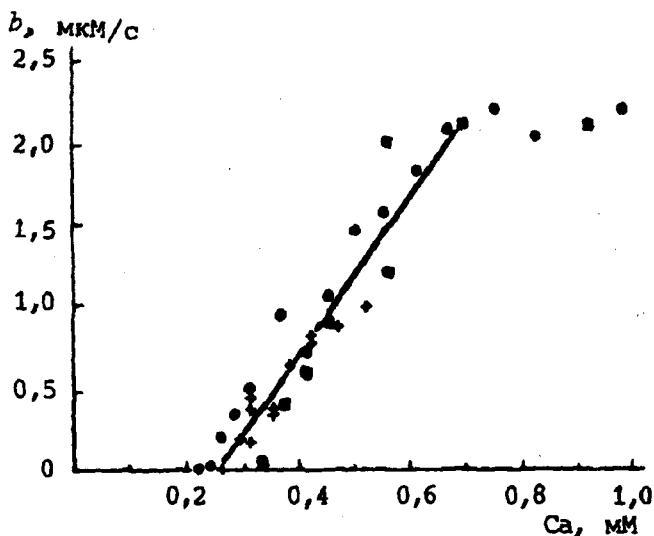


Рис.5. Зависимость скорости расщепления субстрата S в плазме в момент свертывания («b») от концентрации свободного кальция в системе. Данные получены спектрофлуорометрически. Разные обозначения соответствуют разным образцам плазм. (Детали см. в разделе «Результаты и обсуждение»)

ведена на рис.5. Легко видеть, что при концентрациях кальция ниже пороговых тромбин в системе не образуется.

Если сравнить концентрации продукта расщепления тромбинового субстрата в момент образования сгустка (верхние точки кривых на рис.2), то можно заметить, что они слабо отличаются для разных кривых и это естественно, т.к. сгусток возникает всегда при примерно одной концентрации фибрина, а фибрин такой же продукт реакции тромбина, как и АМС. Из этого следует, что величины «а» и «b» качественно ведут себя одинаково. Это видно и из сравнения рис.4 и рис.5.

Аналогичный вывод о существовании в системе свертывания порога по уровню кальция следует и из кривой зависимости времени свертывания от концентрации свободного кальция (рис.1А). Другими словами, это означает, что бесконечно большое время свертывания достигается при конечных (не нулевых) концентрациях кальция. Чтобы убедиться в этом, изобразим эти результаты в новых координатах. Если это гипербола, то величина $1/(T - T_{\min})$ должна линейно зависеть от концентрации кальция. Эта зависимость представлена на рис.1Б (T_{\min} равно 4,5 мин). Экспериментальные точки довольно хорошо ложатся на прямую, пересекающую ось абсцисс при ненулевой концентрации кальция. Значение пороговой концентрации свободного кальция на рис.1,Б составляет 0,2 мМ, что хорошо согласуется со значением, полученным из данных по кинетике образования тромбина.

Полученные результаты однозначно указывают на то, что *in vitro* процесс свертывания плазмы зависит от концентрации кальция пороговым образом. Пороговая концентрация кальция, по-видимому, должна падать с ростом активации системы свертывания (в нашем случае с ростом величины контактной активации). Точный характер такой зависимости требует специальных исследований.

Существование порога по кальцию является серьезным доводом в пользу порогового поведения системы свертывания по отношению к активирующим воздействиям. Пороговое поведение изучаемой системы решающим образом зависит от структуры обратных связей в этой системе.

Экспериментальное изучение кинетики активации факторов IX и X при изменении концентрации кальция может ответить на вопрос о том, какие именно обратные связи играют определяющую роль в механизмах свертывания крови. Кинетику активации этих факторов мы предполагаем исследовать в последующих работах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ханин М.А., Семенов В.В. //Биофизика. 1990. Т.35, №1. С.139.
2. Khanin M.A., Semenov V.V. //J.Theor.Biol. 1989. V.136. P.127.
3. Willems G.M., Lindhout T., Hermens W.Th., Hemker H.C. //Haemostasis. 1991. V.21. P.197.
4. Mann K.G., Nesheim M.E., Church W.R. et. al. //Blood. 1990. V.76. P.1.
5. Козлов А.А., Барковский А.Л., Бовенко В.Н., Пичугина Н.Е. // Патент России №1790604, выдан 22.09.92.

Гематологический научный центр РАМН, Москва

Поступила в редакцию
30.06.1993

THRESHOLD BEHAVIOUR OF THE BLOOD COAGULATION SYSTEM AT CHANGING CALCIUM CONCENTRATION.

ATAULLAHANOV F.I., VOLKOVA R.I., POHILKO A.V., SINAURIDZE E.I.

Haematological Scientific Center, Russian Ac. Med. Sci., Moscow

Dependence of the citrate human blood plasma clotting kinetics on free calcium concentration under its titration with calcium has been studied in vitro. Activation of factor XI is shown to be independent on calcium, while of thrombin concentration increases non-linearly at calcium concentrations in the range 0.2–0.3 mM. Kinetics of the thrombin generation fits well by the exponential function. Power indexes of the exponents rise steeply as calcium concentration increases from 0.2–0.5 mM and reach plateau at higher concentrations. At free calcium concentrations under 0.2 mM the thrombin level does not increase and remains lower than 10 pmol/ml as seen by our measuring system whose sensitivity threshold is surely less than 10 pmol/ml. Thus, the blood coagulation system behaves in a threshold manner under changes of calcium concentration. The threshold concentration of free calcium is equal to 0.2 mM.