

© 1994 г. АТАУЛЛАХАНОВ Ф.И., ГУРИЯ Г.Т.

## ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ АСПЕКТЫ ДИНАМИКИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ. I. ГИПОТЕЗА.

Предложена и проанализирована гипотеза об автоволновом механизме свертывания крови. Предполагается, что рост тромба обеспечивается распространением в крови концентрационной тромбиновой автоволны. При этом в зоне за движущимся фронтом этой волны создаются условия для зарождения еще одной автоволны – волны торможения свертывания. Последняя, двигаясь с большей, чем первая, скоростью на некотором расстоянии от места повреждения достигает тромбиновую волну, останавливая дальнейшее свертывание. Гипотеза согласуется с существующими данными по биохимии системы свертывания. Проанализированы возможные пути ее экспериментальной проверки.

Кровь – жидкость. Поэтому главная задача системы свертывания – защита кровеносной системы организма от кровотоечения. Любые повреждения кровеносной системы должны быстро и эффективно устраняться. Для этого вокруг места повреждения формируется сгусток. Небольшой объем крови вокруг поврежденного места быстро и компактно переходит в твердое состояние. Условия протекания этого процесса предъявляют ряд требований общего характера к пространственно-временной динамике системы свертывания.

1. Сгусток должен быть твердым.

2. Переход из жидкого состояния в твердое должен происходить достаточно быстро.

3. Образующийся сгусток должен быть локализован вокруг области повреждения и иметь четко очерченную границу раздела с кровью.

Первым двум требованиям лучше всего отвечают бистабильные (триггерные) динамические системы (типа систем с фазовым переходом). Такие системы имеют два устойчивых состояния. Переход из одного состояния в другое происходит пороговым образом. То есть при изменении параметра система будет оставаться в исходном состоянии до тех пор, пока не будет достигнуто пороговое значение. После этого система очень быстро перейдет в новое состояние.

Третье требование подразумевает, что факторы активации, с одной стороны, должны быстро распространиться по всей области пространства, которая войдет в сгусток, а, с другой стороны, их концентрация вне этой области должна быть минимальна. Поскольку неизвестно никаких специальных механизмов или систем для переноса активных факторов в пространстве, то напрашивается простое предположение о пассивном диффузионном распространении этих веществ. Однако, это предположение сталкивается с серьезными трудностями:

1. Возрастанию за счет диффузии концентрации активных факторов вблизи поврежденного места препятствуют как их разбавление по мере диффузии в кровь, так и наличие кровотока. Причем наиболее серьезным ограничением для роста концентрации активных факторов за счет простой диффузии служит их вымывание потоком крови. Действительно характерные скорости диффузии белков

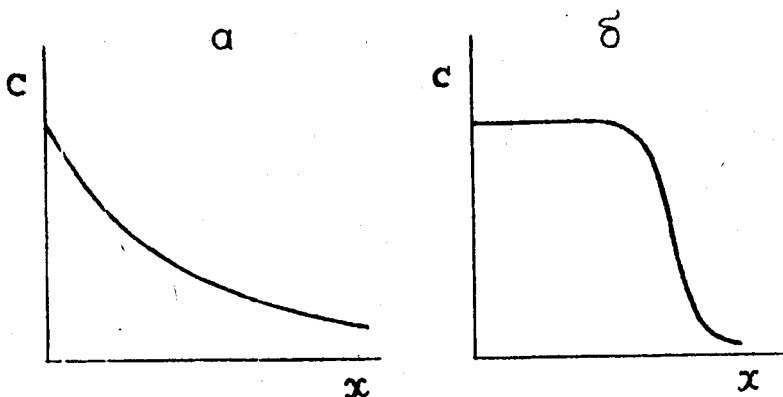


Рис. 1. Распределение концентрации вещества ( $C$ ) вдоль пространственной координаты ( $x$ ) при диффузионном ( $a$ ) и автоволновом ( $b$ ) распространении.

составляют порядка 0,05 мм/мин [1], а скорости кровотока в капиллярах 1-10 мм/мин [2].

2. Профиль распределения в пространстве концентрации диффундирующего вещества не имеет четко выраженных границ. Из-за разбавления концентрация монотонно падает по мере удаления от источника (рис.1, $a$ ). Это затрудняет четкую локализацию границы тромба.

Встает вопрос, как увеличить скорость возрастания концентрации фактора на некотором расстоянии от места повреждения. В рамках сугубо диффузионного механизма этого можно было бы добиться за счет увеличения пространственного градиента концентрации. Локально, большой градиент можно создать за счет быстрого производства в зоне повреждения большого количества активатора. Однако, пассивная диффузия в окружающее пространство приведет к тому, что с ростом расстояния от источника градиент будет быстро падать (рис.1, $a$ ). Столь же быстро будет падать скорость распространения активатора.

Совершенно иначе происходило бы распространение активатора, если бы повышение его концентрации в каждой точке выше определенного порогового значения сопровождалось бы его взрывным автокаталитическим производством в данном месте. В этом случае рассматриваемую систему можно было бы отнести к числу так называемых возбудимых (активных) сред [3]. В последних, как известно, большие градиенты концентраций могут распространяться по пространству с постоянной скоростью.

В такого рода средах возможно распространение концентрационных самоподдерживающихся нелинейных волн – автоволн. В частности, хорошо известно, что автоволны существуют и в бистабильных системах [3, 4]. В этом случае автоволна выглядит как распространение по пространству волны скачкообразного перехода из одного состояния в другое (триггерная волна). На рис.1, $b$  изображен типичный концентрационный профиль триггерной автоволны.

Автоволновое распределение активатора системы свертывания имело бы очевидное преимущество перед чисто диффузионным. Действительно, скорость движения фронта автоволны определяется крутизной этого фронта и может на порядки величин превышать скорость диффузии.

Амплитуда автоволны не меняется в ходе распространения. Отсутствие затухания автоволн в активных средах обусловлено тем, что в них диффузионное размывание фронта волны компенсируется производством распространяющегося вещества в каждой точке среды. При этом ключевую роль обычно играют

автокаталитические реакции. Диффузия же вещества из соседней области пространства приводит к активации его автокаталитического производства в данной точке. В такой системе устойчивое исходное состояние может существовать только при наличии порога возбуждения. Кинетика автоволновой системы при отсутствии диффузии (полном перемешивании) сильно зависит от величины активации и имеет вид, изображенный на рис.2 [5]. Подпороговое возбуждение диссипирует (кривая 1), надпороговое – экспоненциально нарастает (кривая 2).

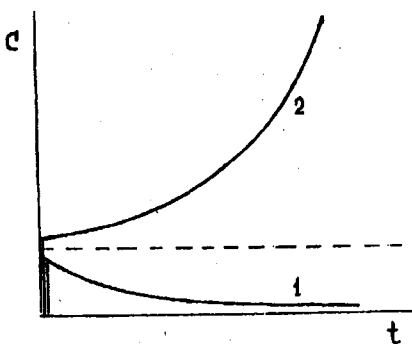


Рис. 2. Кинетика нарастания концентрации тромбина при подпороговой (1) и надпороговой (2) активации системы свертывания. Пунктиром показано пороговое значение активации [5].

Тем самым видно, что одновременно всем априорным требованиям к пространственно-временной организации процесса свертывания крови отвечают активные среды. Ниже мы покажем, что и современные биохимические данные о кинетическом устройстве системы свертывания допускают рассмотрение крови как своеобразной активной среды.

Активация свертывания крови, как известно [6], приводит к запуску каскада ферментативных реакций в поврежденном месте. На рис.3 показана кинетика образования тромбина, фактора, непосредственно катализирующего возникновение фибрина, при активации внутреннего (рис.3,а) [7], и внешнего (рис.3,б) [8] путей системы свертывания. В обоих случаях налицо типичная автокаталитическая кинетика.

Другое важное условие – наличие порога возбуждения. В работах [9,10] теоретически было показано, что система свертывания может вести себя поро-

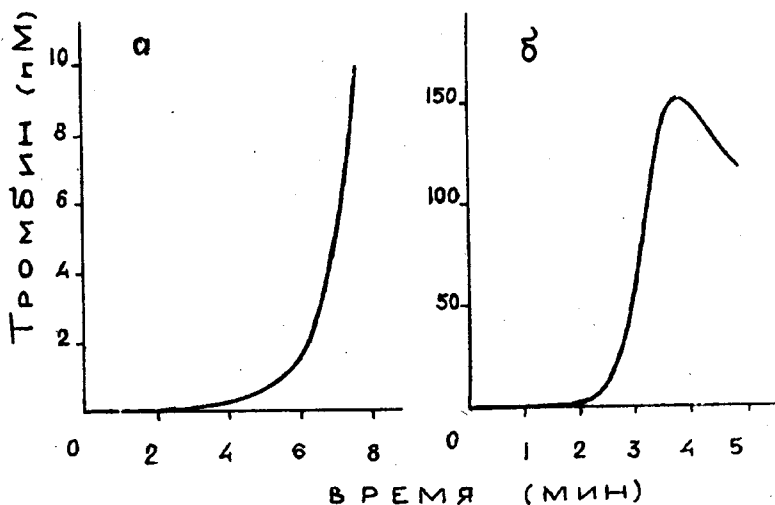


Рис. 3. Кинетика нарастания концентрации тромбина при активации внутреннего (а) [7] и внешнего (б) [8] путей системы свертывания.

говым образом. Это предположение было подтверждено нами экспериментально в работе [7].

Вышеизложенное позволяет предположить, что система свертывания (а вместе с ней и кровь) является активной средой, в которой в принципе могла бы распространяться незатухающая тромбиновая автоволна.

Гипотеза о автоволновой природе распространения тромбина сталкивается с очевидной трудностью. Действительно такая волна, будучи запущена, остановилась бы лишь достигнув естественных границ среды. Это значит, что локальное превышение порога активации системы свертывания автоматически приводило бы к свертыванию крови во всей кровеносной системе. Однако рост реального тромба в крови – процесс самоограничивающийся. Для описания этого свойства нужен механизм остановки тромбиновой волны на конечном расстоянии от зоны повреждения.

Можно представить себе несколько способов остановки волны свертывания. Например, в среде за фронтом тромбиновой автоволны может запускаться вторая автоволна – волна вещества, возникающего после появления тромбина и прекращающего его производство. Если вторая волна распространяется с большей чем первая скоростью, тогда, родившись в зоне активации позже, она сможет догнать и остановить первую волну.

Анализ современных биохимических данных показывает, что среди ферментов, участвующих в процессе свертывания, основным кандидатом на роль вещества, распространяющегося во второй волне, является протеин С [11]. Процесс его активации запускается тромбином, а сам он эффективно прекращает образование тромбина [12].

В принципе, заслуживают обсуждения и другие варианты остановки тромбинской волны. Однако, в данной работе мы ограничимся только анализом вышеизложенного механизма.

Суммируя, сформулируем подлежащую проверке гипотезу: кровь является активной средой нового типа (дважды активная среда). В этой среде локальная активация свертывания приводит к рождению и распространению по пространству концентрационной тромбиновой автоволны. Эта волна распространяется со скоростями, значительно большими, чем диффузионные. В зоне, где прошла волна, возникают условия для зарождения и распространения второй автоволны – волны протеина С. Скорость второй волны больше, поэтому она догоняет первую волну и останавливает ее на некотором расстоянии от места инициации свертывания.

Рассмотрим, не противоречит ли предложенная гипотеза известным данным о системе свертывания крови. На рис.4 сплошными стрелками показана основная (базовая) схема реакций ведущих к образованию тромбина. Анализ гомогенной кинетики (без учета пространственных эффектов) активации факторов свертывания с помощью математических моделей был проведен в работах [9, 13, 14]. И хотя в этих работах моделировали лишь отдельные участки базовой схемы, была показана возможность автокаталитического нарастания концентрации тромбина и наличие порогового поведения.

Проведенное нами рассмотрение моделей, учитывающих базовую схему целиком, показало, что биохимической причиной автокатализа в этой системе является наличие петель положительной обратной связи. Последние обеспечиваются реакциями ( $k_5$ ) и ( $k_8$ ) активации кофакторов  $u_2$  и  $u_8$ . Эти же модели показывают, что пороговое поведение обусловлено наличием реакций с участием ингибиторов, быстро инактивирующих активные формы факторов. На схеме это реакции  $k_i$ , где  $i = 2, 9, 10, 11, 12$ .

Анализ пространственной динамики моделей, базирующихся на основной схеме рис.4 показал, что эти модели не имеют решений автоволнового типа. Однако, если принять во внимание наличие в реальной системе петель поло-

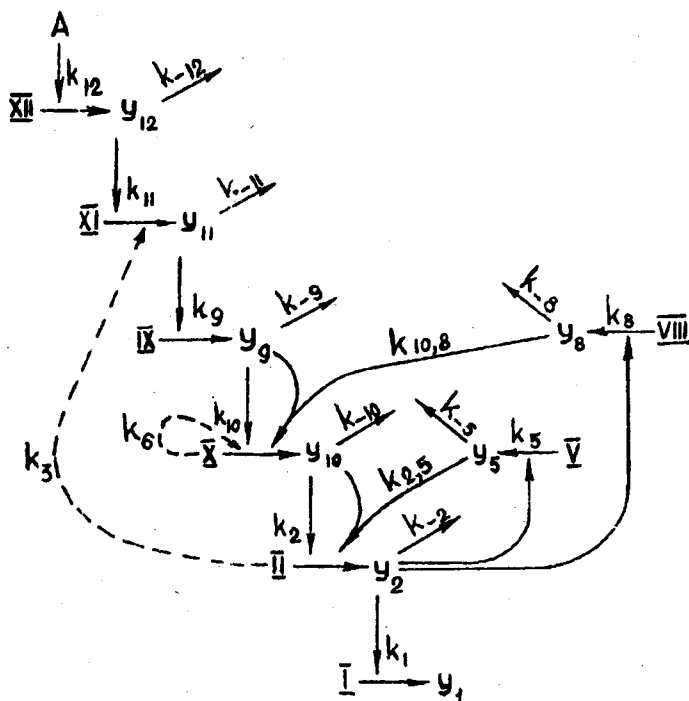


Рис. 4. Схема реакций системы свертывания (пояснения в тексте). Римскими цифрами обозначены неактивные формы (предшественники) соответствующих факторов системы свертывания.  $y_i$  – активные формы тех же факторов.  $A$  – величина контактной активации.

жительных обратных связей, приводящих к активации основных факторов, то автоволновые режимы распространения тромбина действительно окажутся возможными. Реакции обеспечивающие положительные обратные связи такого типа в этой системе известны, они показаны пунктиром на рис.4. В работе [15] описана активация фактора XI тромбином, а в работе [16] – автоактивация фактора X (реакции k3 и k6 на рис.4). Учет любой из этих реакций, делает возможным существование настоящей тромбиновой автоволны.

Механизмы реакций, блокирующих синтез тромбиновой волны пока изучены гораздо хуже. Известно, что имеются ингибиторы активных форм факторов свертывания, которые постоянно присутствуют в крови [15]. Выше уже обсуждалось, что они обеспечивают формирование порога возбуждения. Однако такие ингибиторы не способны остановить активную волну в силу однородности распределения в пространстве. Если такой ингибитор может погасить волну, он же не даст ей родиться. Однако в крови имеется белок, который, как представляется, играет важную роль при остановке тромбиновой волны. Это протеин С [11,12]. Он эффективно разрушает активные формы кофакторов V и VIII, прекращая тем самым образование тромбина [11]. Известно, что основным активатором протеина С является сам тромбин [12]. Известно также, что в процессе активации участвует несколько белков [12].

Факт существования ингибитора тромбина, активируемого самим тромбином, а также сложная кинетика его активации косвенно свидетельствует в пользу автоволновой природы процесса свертывания. Действительно, если бы распрост-

ранение в пространстве тромбина останавливалось бы просто благодаря быстрому спаду концентрации активных факторов по мере удаления от зоны повреждения, то в сложной биохимии наработки ингибитора не было бы никакой нужды. Как функционально бессмысленный блок реакций производства белка С был бы в ходе эволюции утерян.

Для автоволнового распространения активного протеина С необходимо предположить, что кинетика его активации сама по себе имеет автокаталитическую природу, и что для нее характерно пороговое поведение. Существующие данные не противоречат этому, но на сегодняшний день сведений об этой цепочке реакций недостаточно для окончательного решения вопроса.

Информацию об истинном механизме роста тромба можно получить разными способами. В частности, многое может дать дальнейшее изучение кинетики активации системы свертывания и механизмов ее остановки в гомогенной системе *in vitro*. Особый интерес представляет кинетика процессов активации протеина С: имеют ли при этом место автокатализ и пороговое поведение? Однако наиболее информативным, на наш взгляд, представляется прямое изучение процесса свертывания *in vitro* без перемешивания при небольших или даже нулевых скоростях протока.

Процесс роста тромба легко регистрировать оптически, поскольку процесс полимеризации фибрина сопровождается ростом светорассеяния. Наличие хромогенных и флуоресцентных субстратов, специфически расщепляемых разными факторами системы свертывания, позволяет надеяться, что можно зарегистрировать и распространение в пространстве отдельных факторов, в первую очередь, тромбина.

Проще всего было бы исследовать одномерный рост тромба в трубке малого диаметра. Сложность такой постановки эксперимента связана с малыми размерами: по нашим оценкам одномерным можно считать рост тромба в трубках диаметром 0,1 мм и меньше.

Значительно легче наблюдать процесс распространения границы тромба в тонком слое. Если в него внести твердый предмет, хорошо стимулирующий контактную активацию, например стеклянный шарик или волокно коллагена, от него должна начать распространяться волна тромбина. Пройдя определенное расстояние, такая волна должна остановиться.

Следом за волной тромбина будет идти волна полимеризации фибрина. Весь объем пространства, пройденный волной, заполнится полимером фибрина. Профиль этой волны и зависимость скорости движения фронта волны тромбина представляются наиболее информативными для решения вопроса о механизме процесса.

Наибольший интерес и неопределенность связаны с механизмом остановки роста тромба. Поэтому интересно измерить профиль и зависимость скорости роста тромба как функцию расстояния от зоны активации, вплоть до остановки, если таковая будет наблюдаться.

Из соображений устойчивости процесса остановки границы тромба представляется, что зона, захватываемая второй волной, должна быть больше зоны полимеризации, охватывая кольцом область тромба. Это значит, что вторая волна, догнав первую, пройдет еще некоторое расстояние, прежде чем затухнуть. В этой области невозможно вызвать свертывание. Наличие таких зон вокруг остановившихся в росте (или останавливающихся) тромбов представлялось бы наиболее убедительным доказательством существования второй волны. Эффекты такого рода можно было бы зарегистрировать, изучая взаимодействие волн

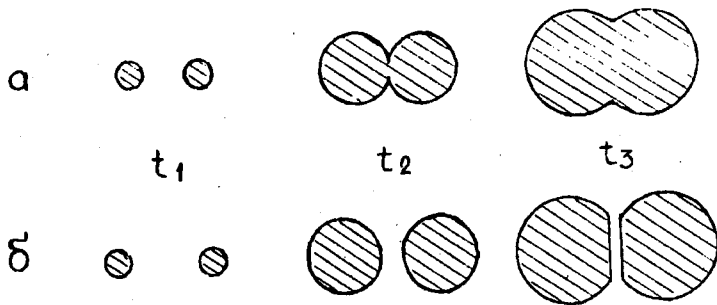


Рис. 5. Взаимодействие двух растущих тромбов при разном расстоянии между ними.

свертывания, растущих от близко расположенных центров. Если волны торможения нет, они всегда будут вести себя так, как показано на рис.5,а.

Если волна торможения существует, то в фазе, когда она догоняет волну активации, возможно появление зон, в которых свертывание заторможено (рис.5,б). В случае массивного зарастания эти зоны должны отделять друг от друга области свертывания, слившиеся на ранних стадиях. Ширина этих зон должна быть примерно одинакова по всей длине.

Детальное исследование динамических эффектов и пространственных структур, возникающих в активной среде, в которой могут существовать две автоволны – активации и торможения, проведено во второй части данной работы с помощью простой феноменологической модели.

Результаты экспериментального изучения процессов роста тромба *in vitro* в тонких слоях изложены в третьей части данного сообщения.

Авторы благодарны Похилко А.В., оказавшей большую помощь в анализе моделей и оформлении рукописи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант N 93-03-5523)

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Geigy Scientific Tables*. Ed. by Lentner C. // 1984, V.3. P.136.
2. Физиология человека. Под ред. Шмидт Р., Тевс Г. // М. Мир, 1986, Т.3. С.114.
3. Жаботинский А.М., Концентрационные колебания. // М. Наука, 1974.
4. Колебания и бегущие волны в химических системах. Под ред. Филд Р., Бургер М. // М. Мир, 1988.
5. Иващицкий Г.Р., Кринский В.И., Сельков Е.Е. Введение в математическую биофизику. // М. Мир, 1976.
6. Blood coagulation. Ed. by Zwaal R.F.A., Hemker H.C. // 1986, V.13, P.103.
7. Атауллаханов Ф.И., Волкова Р.И. и др. // Биофизика, в печати.
8. Hemker H.C., Willems G.M., Beguin S. // *Thromb. Haemost.* 1986, V.56. P.9-17.
9. Ханин М.А., Семенов В.В. // *Биофизика* 1990, Т.35. № 1. С.139.
10. Khanin M.A., Semenov V.V. // *J.Theor.Biol.* 1989, V.136. P.127.
11. Blood coagulation. Ed. by Zwaal R.F.A., Hemker H.C. // 1986, V.13.P. 285.
12. Esmon C.T. // *J.Biol.Chem.* 1989, V.264, P.4743.
13. Willems G.M., Lindhout T., Hermens W.T., Hemker H.C. // *Haemostasis* 1991, V.21. P.197.
14. Jesty J. // *Haemostasis* 1991, V.21. P.208.
15. Gailani D., Broze G.J. // *Science*, V.259. P.909.
16. Jesty J., Spencer A.K., Nakashima Y., Nemerson Y., and Konigsberg W. // *J.Biol.Chem.*, 1975. V.250. P.4497.
17. Blood coagulation. Ed. by Zwaal R.F.A., Hemker H.C. // 1986, V.13. P. 259.

## SPATIAL ASPECTS OF HUMAN BLOOD CLOTING DYNAMICS I. HYPOTHESIS

ATAULLAKHANOV F.I., GURIA G.T.

*National Scientific Centre for Haematology, Moscow.*

General physical requirements concerning spacial development of a thromb as well as modern biochemical kinetic data on blood coagulation system have been analized. The hypothesis assuming an autowave mechanism of blood clotting process is proposed. It is suggested that the thrombin autowave propagates in blood starting from the site of vessel injury. Behind the front of this wave the conditions necessary for appearance of the anticoagulation autowave (which inhibits the clotting process) are being created. The second wave starts later and propagates with greater speed catching up the first one at the definite distance; the clotting process is stoped at this moment. The crucial experiment to verify the hypothesis is proposed.