

© 1995 г. Ф.И. АТАУЛЛАХАНОВ, Р.И. ВОЛКОВА, Г.Т. ГУРИЯ, В.И. САРБАШ

## ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ АСПЕКТЫ ДИНАМИКИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ. III. РОСТ ТРОМБА IN VITRO

Изучены пространственные закономерности роста фибриновых сгустков в тонких слоях плазмы крови. Обнаружено, что рост сгустков останавливается или сильно замедляется после того, как их толщина достигает размера близкого к 0,5 мм. Растущие навстречу друг другу полимерные сгустки срастаются, когда расстояние между центрами активации свертывания менее 1 мм, в то время как при расстоянии порядка 1,5 мм между сгустками сохраняется незарастающий плоский промежуток. В отдельных экспериментах наблюдалось последовательное образование концентрических кольцевых структур. Вокруг центров инициации свертывания выросло до трех, разделенных промежутками несвернувшейся плазмы, фибриновых колец. Полученные данные хорошо согласуются с ранее высказанной авторами гипотезой о существовании автоволновых механизмов регуляции свертывания крови.

Превращение фибриногена в фибрин завершает каскад ферментативных реакций свертывания крови. Молекулярные механизмы этого процесса в течение многих лет являются предметом интенсивных исследований [1,2,3]. Экспериментально динамика пространственного роста фибриновых сгустков наиболее подробно изучалась в системах *in vitro* (с помощью микрокинсьемки или других методов) в условиях сложного гидродинамического потока [4,5,6]. Недавно появились теоретические работы, в которых обсуждается, каким образом молекулярные биохимические механизмы определяют пространственную динамику роста тромба *in vitro* при отсутствии гидродинамических потоков [7,8]. В данной работе представлены результаты соответствующего экспериментального исследования.

*Материалы и методы.* В экспериментах использовали плазму, выделенную из донорской крови, заготовленной на стандартных гемоконсервантах (Глюгидир, CPD, CPDA-1). Конечная концентрация цитрата в такой плазме около 20 мМ. Концентрация свободного кальция при этом лежит в диапазоне 15–30 мкМ. Плазма была практически свободна от клеток (бедная плазма). Концентрация тромбоцитов не превышала  $2 \cdot 10^{10}$ /л. Хранили плазму при комнатной температуре в контейнерах типа «Компопласт-300» в стерильных условиях не более 72 ч от момента заготовки крови.

Пробы для рекальцификации отбирали стерильно. Рекальцификацию выполняли добавлением 10–20 мкл 1 М раствора  $\text{CaCl}_2$  на 1 мл цитратной плазмы. Конечную концентрацию свободного кальция контролировали ионселективным электродом фирмы «Orion Research», «Model 93–20» (электрод сравнения той же фирмы «Model 90–02»). Конечная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  после рекальцификации составляла 1,5–2,0 мМ. В некоторых опытах использовали свежезаготовленную цельную кровь, которую рекальцифицировали так же, как и плазму.

Эксперименты проводили в полистироловых чашках Петри диаметром 40 мм. Чашку помещали в термостатируемую камеру ( $t = 37^\circ\text{C}$ ), расположенную на предметном столике бинокулярной лупы SV8 фирмы «Orion» (Германия) с фотонасадкой, и освещали сбоку параллельно плоскости дна осветителем с лампой накаливания. Второй источник света, осветитель с ртутной лампой ДРШ-250, мог освещать содержимое чашки сверху, под углом 45–50° к поверх-

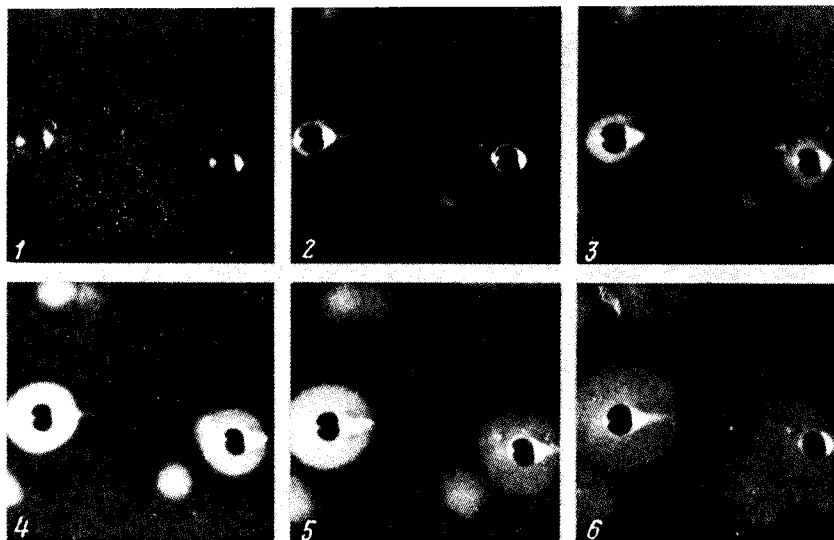


Рис. 1. Возникновение и рост в плазме спонтанно возникающих и инициированных стеклянными шариками фибриновых сгустков. Последовательность кадров - слева направо, сверху вниз, временной интервал между кадрами - 3 мин

ности. Его использовали для возбуждения флуоресценции в опытах с флуоресцентным субстратом тромбина для визуализации образования активного тромбина. Обе лампы были снабжены водяными тепловыми фильтрами. В некоторых экспериментах регистрацию вели с помощью видеокамеры Panasonic G-120 (Япония). В чашку Петри наливали 1 мл плазмы, прогревали 2-5 мин, затем туда добавляли раствор  $\text{CaCl}_2$  и тщательно перемешивали. Толщина слоя плазмы составляла 0,5 мм. Свертывание инициировали помещением в чашку с плазмой стеклянных шариков (диаметр 0,6 мм), поверхность которых сильно активизирует свертывание.

Для исследования распределения активного тромбина в тромбе и его окрестностях использовали, описанный в работе [9], флуоресцентный субстрат тромбина - трипептид  $\text{Woc-Ala-Pro-Arg-7-амино-4-метилкумарин}$ , специально синтезированный в Институте биологической и медицинской химии РАМН. Субстрат добавляли в виде 10 мМ раствора в DMSO (конечная концентрация 0,2 мМ). Тромбин отщепляет от этого пептида 7-амино-4-метилкумарин (АМС), который сильно флуоресцирует (максимум - при 440 нм). Для возбуждения флуоресценции из спектра испускания ртутной лампы с помощью стеклянного фильтра УФС-1 вырезали ультрафиолетовую область. Окрашивание препаратов на белок проводили фиолетовым кристаллическим красителем.

*Экспериментальные результаты.* Спустя 7-10 мин после помещения в чашку Петри слоя рекальцифицированной плазмы, в ней в разных местах спонтанно возникают и начинают расти сгустки (тромбы). Граница этих образований с жидкой плазмой четко очерчена (рис. 1). Процесс рождения новых сгустков продолжается до тех пор, пока в чашке есть области жидкой плазмы.

В рассматриваемой системе свертывание может быть запущено и искусственно. Формирование фибриновых структур, инициируемых частицами с коагулогически активной поверхностью, происходит с точно такой же пространственно-временной динамикой, что и структур, инициируемых спонтанно возникающими центрами. Свертывание начинается примерно в одно время, толщина слоя сгустка и скорость роста на разных частицах примерно одинакова (рис. 1).

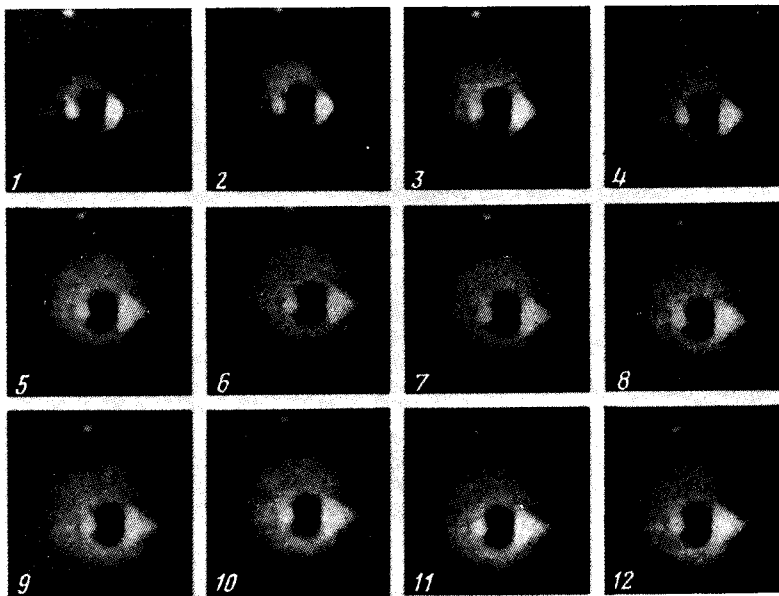


Рис. 2. Последовательные этапы формирования фибринового сгустка конечных размеров при инициации свертывания поверхностью стеклянного шарика. Рост сгустка практически прекращается после достижения характерного размера порядка 0,5 мм (фото 6). Фотографии соответствуют следующим моментам времени: 1-я - 10 мин с момента контакта с шариком, фотографии со 2-й по 12-ю сделаны с интервалом в 3 мин

На рис. 2 показано изменение размера сгустка в зависимости от времени. В динамике роста сгустка четко выделяются две стадии. На первой - рост происходит с практически постоянной скоростью (рис. 2, 1-5), а на второй - после того как сгусток достигает в диаметре примерно 1,5 мм (с учетом диаметра стеклянного шарика) - имеет место резкое торможение роста (рис. 2, 6-12).

Если центры, иницирующие свертывание расположены достаточно близко друг от друга (на расстоянии менее 1 мм), то, увеличиваясь в размере, сгустки просто срастаются, формируя один общий сгусток (рис. 3). Однако если центры возникают на большем удалении друг от друга (более 1,5 мм), то встречный рост сгустков прекращается раньше, чем их рост в других направлениях. Форма встречных границ обоих тромбов становится более плоской. Между сгустками остается полоса несвернувшейся жидкой фазы, которая продолжает существовать в течение 1 ч и более (рис. 4).

Для исследования распределения активного тромбина в зоне роста тромба в плазму добавляли флуоресцентный субстрат тромбина и регистрировали параллельно рост сгустка по изменению светорассеяния и появление активности тромбина по изменению флуоресценции. На рис. 5 видны последовательные картины развития флуоресценции, связанной с расщеплением пептидного субстрата тромбином при росте сгустков от стеклянных шариков. Зоны сильной флуоресценции с четко очерченными краями, выявляющие области появления активного тромбина (рис. 5, 1-3), совпадают по размерам с формирующимися фибриновыми сгустками, наблюдаемыми при выключении источника ультрафиолета. На более поздних этапах (рис. 5, 4-9) размер сгустка не меняется, а

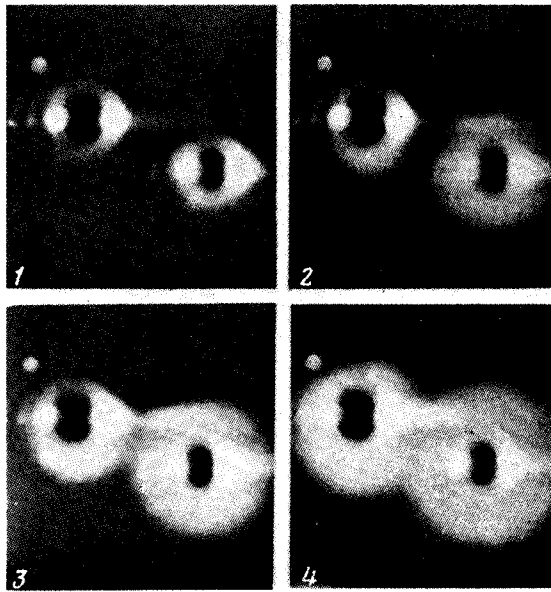


Рис. 3. Рост фибриновых сгустков от двух близко расположенных ( $\sim 0,6$  мм) стеклянных шариков. Срастание тромбов

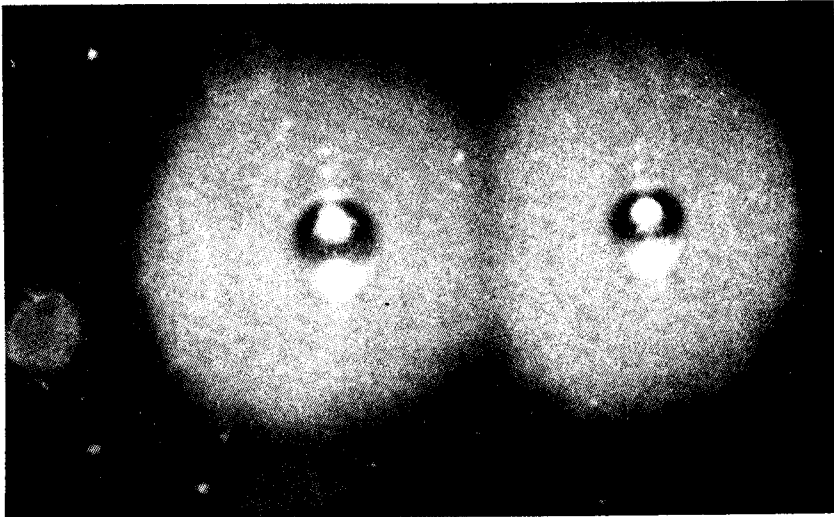


Рис. 4. Результат взаимодействия двух растущих фибриновых сгустков, центры которых располагаются на большом расстоянии ( $> 1,5$  мм) друг от друга. Видно, что полного срастания тромбов не происходит. Фотография соответствует 40 мин инкубации

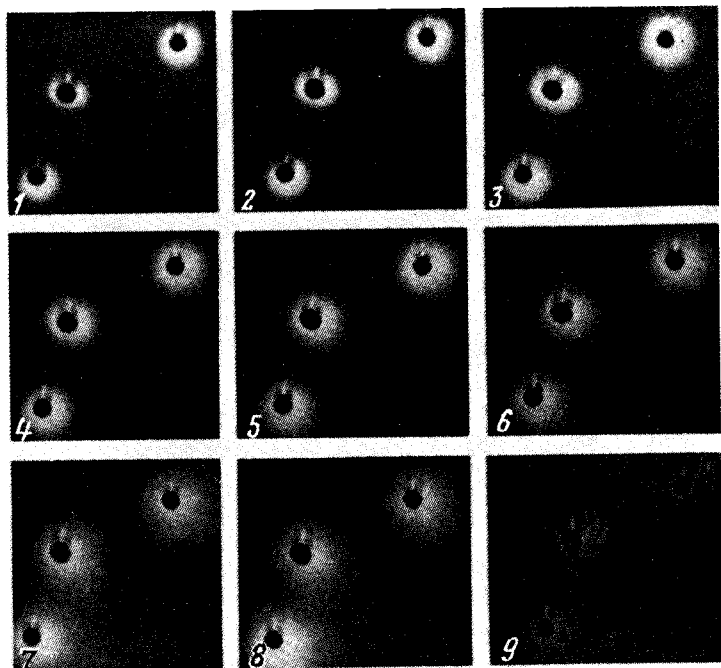


Рис. 5. Распределение в пространстве вокруг центров инициации свертывания (стеклянных шариков) флуоресцентного продукта (АМС), возникающего из соответствующего субстрата, в зонах работы тромбина (фотографии 1 - 4), и последующее более медленное размывание границ светящейся зоны, обусловленное, по-видимому, диффузионным распределением ранее образовавшегося АМС. Фотографии соответствуют следующим временам: 1 - 10, 2 - 13, 3 - 16, 4 - 19, 5 - 21, 6 - 24, 7 - 27, 8 - 30, 9 - 90 мин

размытая граница светящейся зоны, по-видимому, является результатом диффузии АМС из сгустка.

В отдельных опытах наблюдалось формирование кольцевых структур. Примерно за 10-12 мин формировался фибриновый слой на поверхности иницирующих свертывание стеклянных шариков (рис. 6,1,2). В течение следующих 18 мин картина не претерпевала никаких внешних изменений. Затем начинался рост нового фибринового слоя на некотором удалении от первого. Плазма в разделяющей слое зоне оставалась жидкой. Рост второго слоя шел так же быстро, как и первого. Он останавливался после того, как слой достигал примерно той же толщины, что и первый (рис. 6,3). Затем образовывался третий слой (рис. 6,4). Интенсивность второго и последующих слоев часто бывает низка. При этом по светорассеянию можно видеть только первый сгусток. Однако если через 1 ч и более после начала свертывания слить несвернувшуюся плазму и прокрасить белок, оставшийся на поверхности чашки, можно наблюдать кольцевые структуры небольшой амплитуды (рис. 7). Экспериментальные условия, необходимые для формирования таких структур, в настоящее время требуют дальнейшего детального уточнения.

Характер роста тромба несколько меняется, если чашку Петри закрывают крышкой сразу после помещения в нее стеклянных шариков. Начальные стадии процесса очень похожи на описанный выше рост сгустков в открытой чашке. Однако после достижения критического размера рост не останавливается, а лишь сильно замедляется, продолжаясь непрерывно (рис. 8). При встречном распространении таких фронтов они срастаются. Несмотря на то, что в этом случае имеет место непрерывный рост, все описанные выше особенности процесса

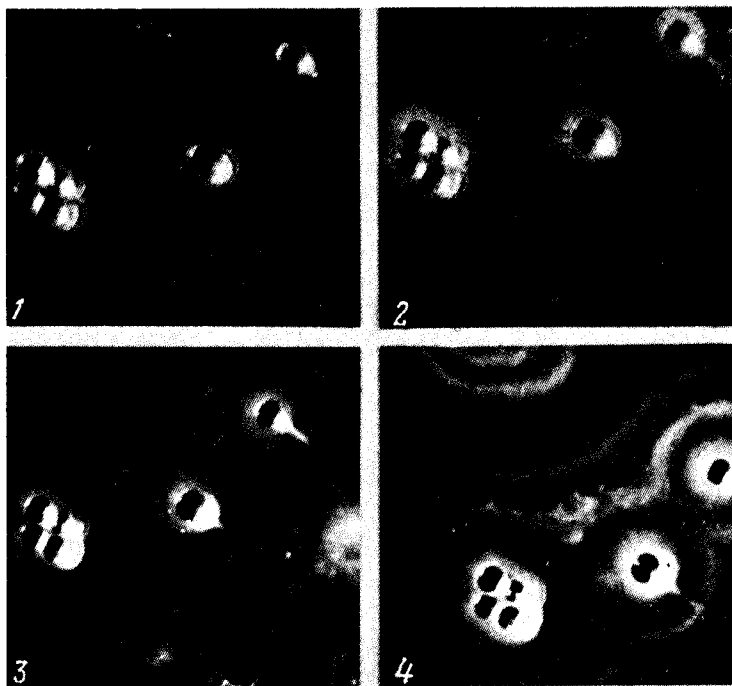


Рис. 6. Динамика формирования кольцевых структур. Свертывание в плазме было инициировано добавлением стеклянных шариков. Фотографии соответствуют следующим временам инкубации: 1 - 8, 2 - 14, 3 - 32, 4 - 50 мин

торможения все же имеют место, однако в сильно смазанном виде. Два сталкивающихся фронта хотя и срастаются, но плотность тромба между ними низка. Зоны столкновения разных сгустков отчетливо различимы на фотографиях даже спустя 30 мин после их соединения (рис. 9).

*Обсуждение результатов.* Как видно на рис. 1, конечная толщина слоя полимеризованного сгустка практически не зависит от размера и материала

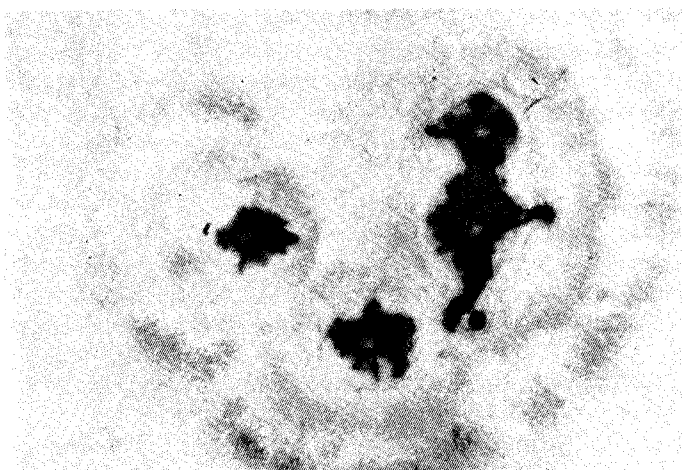


Рис. 7. Кольцевые структуры, проявляющиеся только после прокраски на белок образовавшихся в чашке Петри сгустков

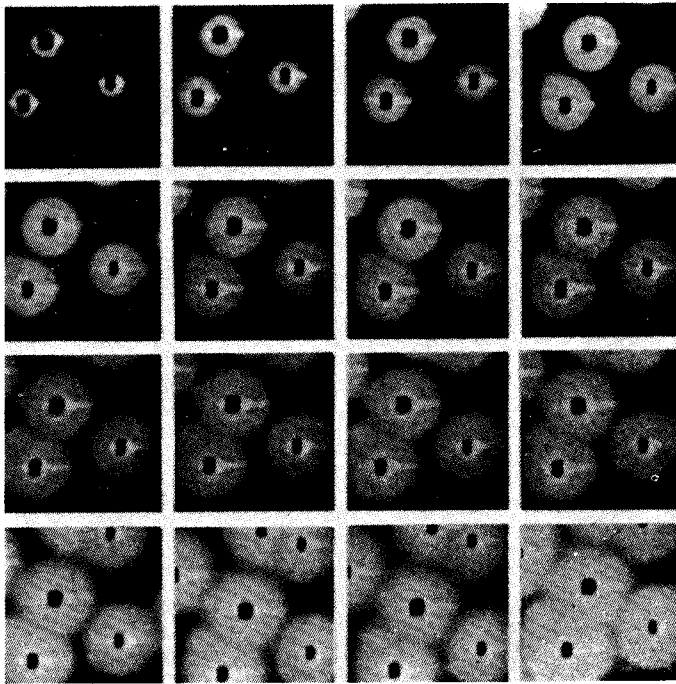


Рис. 8. Безостановочный рост фибриновых сгустков, инициированный добавлением стеклянных шариков в плазму, помещенную в закрытую чашку Петри. Фотографии соответствуют следующим моментам времени от начала инкубации (последовательность кадров слева направо, сверху вниз): 1 - 10, 2 - 16 мин, интервал между следующими кадрами 3 мин.

активирующих частиц. Это указывает на то, что динамика роста сгустка определяется главным образом собственно молекулярно-кинетическими свойствами биохимической системы регуляции свертывания, а не начальным запускающим сигналом.

Нечувствительность к начальным условиям характерна для многих из ранее открытых структур в существенно неравновесных самоорганизующихся системах. Как известно, такие типичные характеристики автоволновых режимов как собственная частота автоколебаний и скорость автоволны не зависят от начальной амплитуды и фазы [9–11]. В рассматриваемой системе мы, по-видимому, сталкиваемся с новой внутренней характеристикой неравновесных систем (авторазмером), которая характеризует предопределенный кинетическим устройством системы пространственный масштаб [8]. (В данном случае – расстояние, на которое способна распространиться концентрационная тромбиновая волна).

Как показывают эксперименты с флуоресценцией, передний фронт движущегося концентрационного тромбинового профиля является крутым (рис. 5, 1–4). Лишь после остановки роста сгустка наблюдается обычное диффузионное размывание возникшей области повышенной концентрации АМС (рис. 5, 5–9). Это свидетельствует о том, что после остановки роста сгустка образование новых флуоресцентных продуктов прекращается, а появившиеся ранее диффундируют в зону, где сгустка уже нет.

Формирующиеся в ходе свертывания структуры растут со скоростями, значительно превышающими характерные диффузионные. Практическая независимость скорости роста вплоть до зоны остановки от типа активирующей поверхности, а также «крутые», резко очерченные пространственные границы обра-

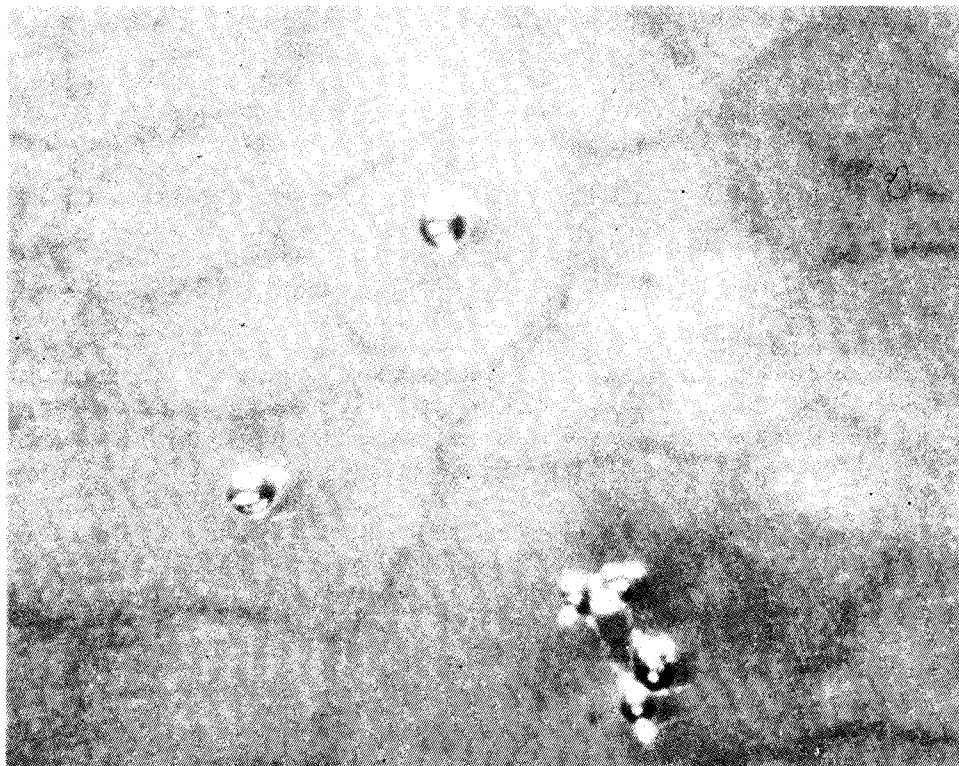


Рис. 9. Пространственная структура, возникающая в чашке Петри после срастания сгустков в плазме, где рост тромбов шел без остановок. Фотография соответствует 40 мин инкубации

зующегося сгустка (тромба) совершенно не характерны для пассивного, то есть чисто диффузионного распределения вещества в пространстве. Эти наблюдения согласуются с представлениями о том, что рост тромба на ранней стадии определяется распространением достаточно крутой тромбиновой автоволны [7,8].

Взаимодействие двух тромбов, растущих навстречу друг другу (рис. 4 и 9), хорошо согласуется с предсказаниями гипотезы [7]. Однако в настоящее время недостаточно данных, чтобы уверенно сказать, что зоны несвертывания действительно связаны с ингибированием действия тромбина, а, скажем, не с исчерпанием фибриногена. Имеющиеся в литературе данные о молекулярных механизмах свертывания [1-3] представляются недостаточными для понимания природы процессов остановки роста тромба.

Сравнение с феноменологической моделью [8] показывает, что экспериментально наблюдаются качественно те же режимы, что и предсказывает модель. В опытах с открытой крышкой наблюдается рост тромба с резкой остановкой и формирование четких линейных зон торможения (рис. 4). Согласно модели, режимы такого рода должны иметь место при большой величине порога активации свертывания. При уменьшении порога активации, согласно модели, в узкой зоне значений должно иметь место формирование кольцевых структур. Такие структуры действительно иногда удавалось наблюдать в экспериментах, однако конкретные условия их реализации остаются не до конца выясненными. Дальнейшее уменьшение порога активации, в соответствии с моделью, должно приводить к смене быстрой фазы роста медленной. Именно так и происходит в эксперименте. Непрерывный медленный рост сгустка после формирования основного ядра особенно отчетливо наблюдается в опытах с закрытой крышкой (рис. 7 и 8).



В заключение отметим, что несмотря на то, что в серии проведенных нами опытов были действительно обнаружены предсказанные явления формирования локализованных и пространственно-регулярных структур в плазме крови, что является веским аргументом в пользу выдвинутой ранее двухволновой гипотезы, тем не менее нам представляется преждевременным считать гипотезу доказанной. Так, различия в характере роста сгустка в ситуации с открытой и закрытой крышкой указывают на то, что большую роль в регистрируемых явлениях может играть конвекция. Только дальнейшие эксперименты по выяснению не только качественных, но и количественных характеристик роста тромба позволят окончательно прояснить механизм, ответственный за пространственную динамику тромбообразования.

Выражаем признательность своим коллегам по работе: акад. А.И. Воробьеву, А.В. Похилко, Б.Е. Мовшеву, А.Ю. Сафрошкиной за помощь в работе и плодотворные дискуссии и Е.И. Синауридзе за ценные критические замечания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 93-03-5523, грант № 94-0413108а).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hemker H.C., Beguin S., Lindhout T. // Coagulation and Blood Transfusion. Proc. 15th Annu. Sump. Blood Transf., Croningen, 1990, Dordrecht, 1991.
2. Bioregulatory functions of thrombin. /Eds. Walz D.A., Fenton J.W.II, Shuman M.A., Ann.N.Y. Acad.Sci. 1986. V.485.
3. Davie E.W., Fujikawa K., Kisiel W. // Biochemistry. 1991. V.30. P.10363.
4. Mueller-Mohnssen H., Schauerte W. // Fibrinogen and its derivatives. Biochemistry, physiology and pathophysiology. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomed.Division). 1986. P.169.
5. Chandler A.B. // Lab.Inv. 1958. V.7. P.110.
6. Christy J.R.E., Macleod N. // Cardiovasc. Res. 1989. V.23, № 11. P.949.
7. Атауллаханов Ф.И., Гурия Г.Т. // Биофизика. Т.39, №1. С.89.
8. Атауллаханов Ф.И., Гурия Г.Т., Сафрошкина А.Ю. // Биофизика. Т.39, № 1. С.97.
9. Kawabata S., Miura T., Morita T. et al. // Eur.J.Biochem. 1988. V.172. P.17.
10. Андронов А.А., Витт А.А., Хайкин С.А. Теория колебаний. М.: Наука, 1981.
11. Скотт Э. Волны в активных и нелинейных средах. М.: Советское радио, 1977.
12. Николис Г., Пригожин И. Самоорганизация в неравновесных системах. М.: Мир, 1979.

Гематологический научный центр РАМН, Москва

Поступила в редакцию  
4.03.94

### SPATIAL ASPECTS OF THE DYNAMICS OF BLOOD COAGULATION. III. THROMBUS GROWTH IN VITRO

F.I. ATAULLAKHANOV, R.I. VOLKOVA, G.T. GURIYA, V.I. SARBASH

*Haematological Scientific Centre, Russian Acad. Med. Sci., Moscow*

The growth of fibrin clots in thin blood plasma layers was studied. It was found that the clot growth stops or is strongly retarded if its thickness approaches 0,5 mm. Polymer clots growing toward each other fuse together at distances between the coagulation activation centers less than 1 mm, whereas at distances of about 1,5 mm, the clots are separated by ungrowing flat gaps. In some experiments, successive formation of concentric ring-shaped structures was observed. Around the centers of coagulation initiation, up to 3 fibrin rings separated by areas of uncoagulated plasma were formed. The data agree well with the hypothesis advanced by the authors earlier that blood coagulation is regulated by auto-wave mechanism.