

ОБЩЕСТВО БОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЕЙ

# Н О В О Е

ВЫПУСК 35

В ТРАНСФУЗИОЛОГИИ



35

Москва 2003

Ф.И. Атауллаханов, А.И. Воробьев, А.А. Бутылин,  
Е.И. Синауридзе, М.В. Ованесов

## ПАРАДОКС ГЕМОФИЛИИ И РОСТ СГУСТКА В ПРОСТРАНСТВЕ

### *Paradox of Hemophilia and spatial clot growth*

Хорошо известно, что свертывание крови может быть активировано по двум путям: внешнему и внутреннему (контактная активация). В последние годы получено много доказательств в пользу того, что обычно в организме свертывание активируется только по внешнему пути [1]. Однако все основные виды гемофилии (А, В или С) вызываются дефицитами факторов, формально входящих во внутренний путь свертывания. В чем же состоит причина этого парадокса гемофилии? Почему, несмотря на то, что основной путь активации свертывания не нарушен, у больных гемофилией наблюдается отчетливо выраженная кровоточивость?

Итак, внешний путь у больных гемофилией активируется совершенно нормально. Стандартный *in vitro* тест, характеризующий состояние внешнего пути свертывания (протромбиновое время (ПВ)), не показывает отличий между плазмой больных гемофилией и плазмой здоровых доноров [2]. Чтобы определить наличие гемофилии *in vitro*, надо проводить другой стандартный тест – тест по определению активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), который запускает свертывание по внутреннему пути в условиях полной контактной активации плазмы каолином. Этот тест чувствителен к нарушениям во внутреннем пути свертывания и дает большие различия в показателях времени свертывания у больных гемофилией и здоровых людей, что еще раз подчеркивает важность внутреннего пути для суммарного процесса тромбообразования.

Существует большая разница между тем, в каких условиях исследуется свертывание *in vitro* (в пробирке), и тем, как этот процесс происходит в организме.

В пробирку помещается кровь или плазма, туда же помещается активатор свертывания — либо тканевой фактор в виде мелких везикул, либо активатор внутреннего пути, каолин, тоже в виде мелких частиц. Все быстро и тщательно перемешивается. Определяется время, через которое кровь свернется. В таких условиях концентрации всех участников процесса одинаковы по всему объему, и свертывание идет во всем объеме одновременно. Вся взятая для анализа кровь сворачивается, и сгусток занимает весь объем образца (рис. 1, вверху).

В организме в кровотоке, этот процесс происходит совсем иначе (рис. 1, внизу). Повреждение сосуда приводит к тому, что сначала свертывание активируется в небольшой зоне около поврежденного места. Из этой зоны распространяется волна тромбина, сгусток растет от поверхности вглубь сосуда. Процесс не происходит одновременно во всем объеме — он идет только в зоне повреждения, сгусток не занимает весь объем крови, а растет локально в месте активации, закрывает поврежденную поверхность и прекращает рост.

На наш взгляд именно это различие в пространственной организации процесса *in vivo* и *in vitro* играет решающую роль, потому что одни и те же реакции системы свертывания по-разному вовлекаются в процесс в гомогенной системе и при свертывании в пространстве, участвуя в разных фазах этого процесса.

Поскольку рост сгустка — это пространственно организованный процесс, и в организме он может сильно отличаться от того, что наблюдается в пробирке, то, чтобы изучать свертывание в условиях гораздо более близких к ситуации *in vivo*, мы разработали новый метод, позволяющий регистрировать рост сгустка в пространстве [3-6].

В работе были использованы образцы плазмы здоровых доноров, имеющих нормальные уровни тестов АЧТВ и ПВ, а также образцы плазм пациентов с тяжелыми формами гемофилии А или В (активность фактора VIII:C или IX:C, соответственно, измеренная с помощью одностадийного метода,  $\leq 1\%$  от нормы).

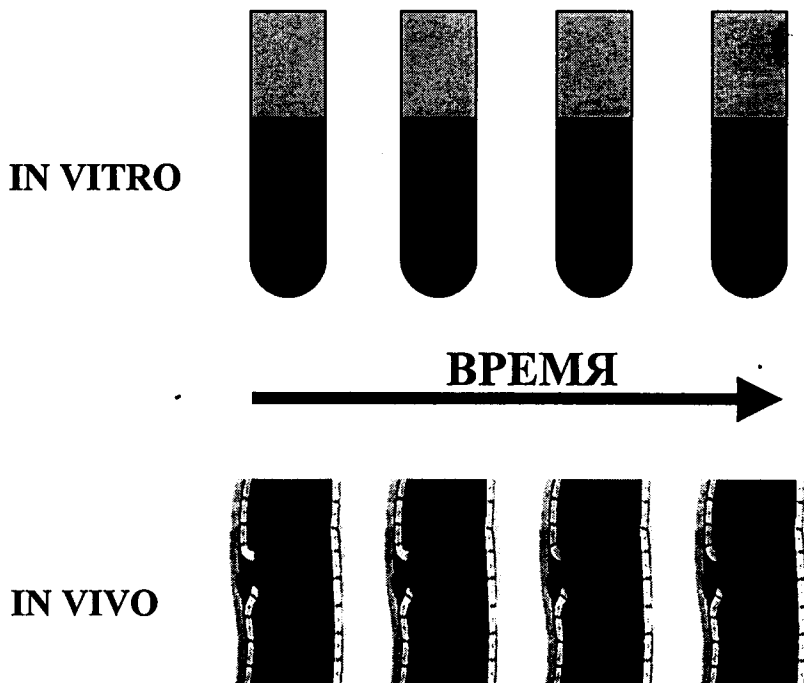


Рисунок 1. Сравнение двух процессов свертывания крови во времени: *in vitro* в пробирке, (вверху рисунка) и *in vivo* в кровеносном сосуде (внизу).

В пробирке образование тромба идет во всем объеме одновременно (потемнение соответствует затвердению тромба).

В кровеносном сосуде затвердевает только часть крови в области повреждения стенки.

Образцы крови взяты в 3.8% раствор цитрата натрия (рН 5.5) в соотношении 9:1. Для отделения клеток кровь была центрифугирована сначала 15 минут при 1500 g, а затем, для получения свободной от тромбоцитов плазмы, еще 5 минут при 10000 g. Уровень рН в плазме стабилизировали в области 7.2–7.6 с помощью обработки молочной кислотой [4]. Обработка не изменяла стандартных показателей времени свертывания (ПВ и АЧТВ) или скорости роста сгустка в полученной плазме по сравнению с исходной.

Для активации свертывания использовали монослой фибробластов клеточной линии легких эмбриона человека (Институт Вирусологии РАМН), которые были выращены в Институте Иммунологии МЗ РФ на полиэтилентерефталевых пленках (Объединенный институт ядерных исследований, Дубна) [5, 6].

Все использованные реактивы были максимально-возможной степени очистки.

Скорости пространственного роста сгустков были измерены в отсутствии перемешивания на специально сконструированной установке [4–6]. Плоская полистироловая камера, в которой происходило свертывание, имела толщину 1 мм. Одна из вертикальных стенок камеры представляла собой стеклянную пластинку толщиной в 1 мм, обернутую пленкой с выращенным на ней монослоем фибробластов. Клетки на пленке предварительно трижды промывали раствором Хенкса. Сразу после рекальцификации (9 мкл 1M раствора  $\text{CaCl}_2$  на 450 мкл плазмы) образец переносился в собранную камеру ( $t=0$ ). За скоростью роста сгустка следили по изменению светорассеяния плазмы в зоне 7.2x5.4 мм с помощью CCD камеры EDC 1000 D (Electrim Corp., NJ, USA), соединенной с компьютером. Данные о светорассеянии записывались каждые 30 сек и сохранялись в виде последовательности файлов. Все опыты проводили при 37°C.

При контакте тонкого слоя плазмы с фибробластами, несущими на поверхности тканевой фактор, на границе между плазмой и клетками активируется свертывание. Сгусток начинает расти, и его фронт непрерывно удаляется от места активации.

При исследовании свертывания крови у больных гемофилией А или В с помощью этого нового метода видно, что разница между гемофильной плазмой и плазмой нормальной в этом тесте отчетливо связана не с процессом активации свертывания, а с процессом роста сгустка в пространстве. Активация свертывания в нормальной плазме и в плазме больных гемофилией (А или В) начинается примерно одновременно, практически сразу после контакта плазмы со слоем фибробластов. Однако дальше процесс развивается совсем по-разному. Если в случае с нормальной плазмой сгусток растет ровным фронтом, равномерно, почти с постоянной скоростью удаляясь от зоны активации, то в случае гемофильной плазмы он практически не растет: очень неровный фронт, медленно движущийся в пространстве со скоростью примерно в три раза меньшей, чем скорость роста сгустка в норме. Совершенно отчетливо видно, что основные нарушения происходят именно в этой фазе роста сгустка (рис. 2).

Анализ этих экспериментальных данных и сопоставление их с нашими знаниями о том, какие биохимические реакции происходят при свертывании, позволили нам понять и сформулировать представление о том, что процесс свертывания крови в организме состоит из трех отчетливо разделенных во времени и в пространстве фаз.

**Первая фаза** инициации свертывания в организме начинается в зоне повреждения на поверхности клеток субэндотелия. Реакции, связанные с этой фазой, происходят только на этой поверхности. Они не могут происходить во всем объеме крови по той простой причине, что тканевый фактор иммобилизован на поверхности клеток и в кровь не попадает. Эти реакции приводят к образованию некоторой начальной концентрации тромбина.

Концентрация тромбина у поверхности в зоне повреждения может оказаться довольно большой. Образовавшийся тромбин уже не привязан к поверхности и начинает диффундировать в кровь, и там, куда он диффундировал, начинается **вторая фаза** пространственного роста. Сгусток растет из зоны повреждения в глубину кровотока.

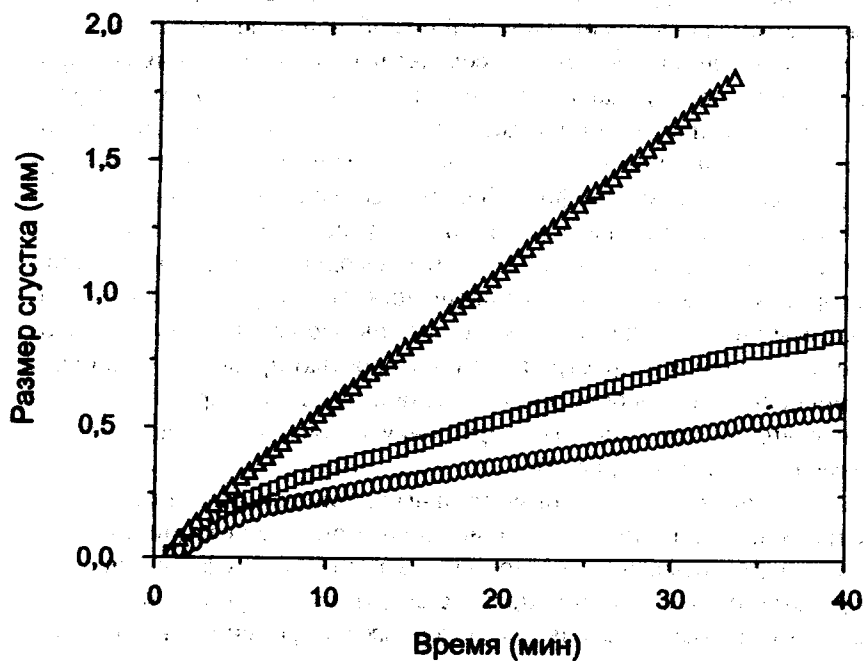


Рисунок 2. Зависимость размеров сгустка от времени.  
Треугольники – нормальная плазма, квадраты – гемофилия А,  
кружочки – гемофилия В.

Этот процесс обусловлен, во-первых, диффузией тромбина из области повреждения вглубь, а во-вторых, реакциями, в которых тромбин вызывает образование VIIIa и IXa факторов и ускоряет тем самым активное собственное производство. Таким образом, в этой фазе роста сгустка все определяется реакциями внутреннего пути, только начинающимися не с XII фактора, а с самого тромбина. Тромбин, в небольшом количестве продиффундировавший из зоны инициации (зоны повреждения) вглубь крови, вызывает там активацию, точнее, образование VIIIa и IXa факторов, образование теназы и запуск интенсивного производства тромбина. Новые порции тромбина, образовавшиеся в каждой из этих зон, диффундируют в разные стороны в кровь и тем самым вызывают вновь и вновь повторение этого процесса. Таким образом, происходит непрерывное распространение и самопроизводство или самоактивация тромбина. Возникает волна тромбина, которая бежит из зоны повреждения, оставляя за собой твердый сгусток. Это фаза роста сгустка. Она обладает свойствами самоподдерживания, то есть может распространяться уже самостоятельно и не требует для этого никаких специальных активаторов. Ей не нужен ни фактор XII, ни тканевой фактор.

**Третья фаза свертывания** — фаза остановки роста сгустка или фаза остановки свертывания. Она происходит на некотором расстоянии от зоны активации. В этой фазе существенную роль играют реакции, которые здесь еще не рассматривались. Это, в основном, реакции, связанные с активацией протеина С тромбином и с тем, что активированный протеин С начинает разрушать кофакторы системы свертывания, Va и VIIIa (рис. 3). В результате прерывается производство теназы и протромбиназы и, соответственно, прекращается производство тромбина. Рост сгустка останавливается. В этом процессе, как показали наши модельные исследования [7-10], еще много неясного. Следует отметить, что процессы активации протеина С обладают свойствами самоускорения, так же как и реакции, ведущие к образованию тромбина. Недавно было показано, что активированный протеин С может ускорять свое собственное производство [11].



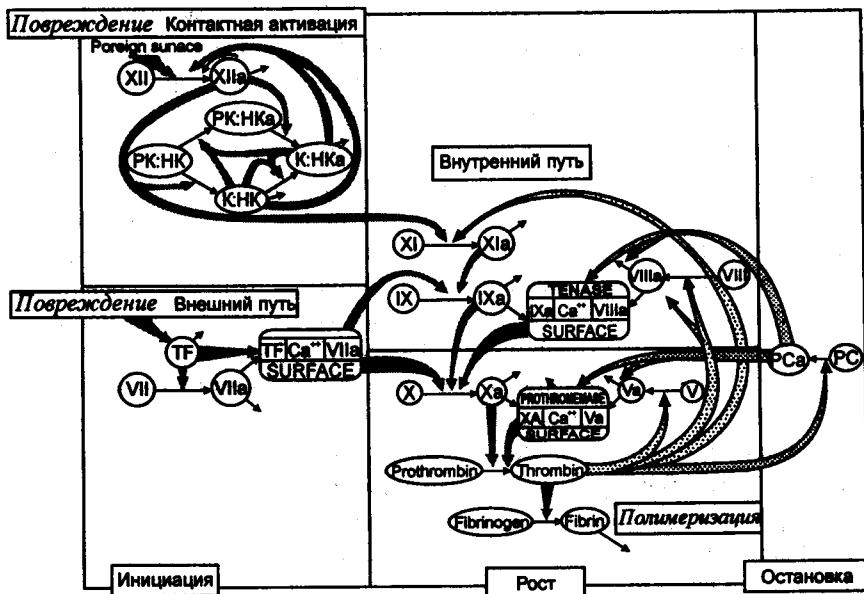


Рисунок 3. Общая схема реакций свертывания. Римскими цифрами обозначены предшественники факторов свертывания, индекс а обозначает активную форму факторов, TF – тканевой фактор, PC – протеин С, РК – прекалликреин, К – калликреин, НК – кининоген высокого молекулярного веса

Таким образом, исследование пространственной динамики свертывания крови в норме и у больных гемофилией показало, что гемофилии – это болезни роста тромба. Процесс свертывания в организме, в естественных условиях, происходит в три фазы. Фазы сменяют друг друга последовательно и происходят они в различных областях пространства. У больных гемофилией нарушена вторая фаза – рост сгустка. Рост сгустка у этих больных практически не происходит, а образующийся тонкий неровный сгусток, который локализован в узкой зоне на поврежденной поверхности сосуда, не в состоянии обеспечить эффективную защиту от кровотечения. В этом и состоит разрешение парадокса гемофилии. Активация свертывания у больных гемофилией идет нормально, а дальнейший рост сгустка в объеме происходит плохо.

#### Литература

1. Butenas S., Mann K.G. - Blood coagulation, *Biochemistry* (Moscow), 2002, 67(1):3-12.
2. Gawthorn K.M., van't Veer C., Lock J.B., DiLorenzo M.E., Branda R.F., Mann K.G. - Blood coagulation in hemophilia A and hemophilia C, *Blood*, 1998, 91(12):4581-4592.
3. Ataullakhanov F.I., Guria G.T., Sarbash V.I., Volkova R.I. - Spatiotemporal dynamics of clotting and pattern formation in human plasma, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1425(3):453-468.
4. Sinauridze E.I., Volkova R.I., Krasotkina Yu.V., Sarbash V.I., Ataullakhanov F.I. - Dynamics of clot growth induced by thrombin diffusing into citrate human plasma, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1425(3):607-616.
5. Ovanesov M.V., Krasotkina J.V., Ul'yanova L.I., Abushinova K.V., Plyushch O.P., Domogatskii S.P., Vorob'ev A.I., Ataullakhanov F.I. - Hemophilia A and B are associated with abnormal spatial dynamics of clot growth, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1572(1):45-57.
6. Ovanesov M.V., Lopatina E.G., Saenko E.L., Ananyeva N.M., Ul'yanova L.I., Plyushch O.P., Butilin A.A., Ataullakhanov F.I. - Effect of factor VIII on tissue factor-initiated spatial clot growth, *Thromb. Haemostasis*, 2003, 89(2):235-242.
7. Ataullakhanov F.I., Zarnitsina V.I., Kondratovich A.Y., Lobanova E.S., Sarbash V.I. - A special class of autowaves, autowaves with a stop,

- determines spatial dynamics of blood coagulation [in Russian], *Uspekhi Fizicheskikh Nauk*, 2002, 172(6): 671-690.
8. Zarnitsina V.I., Ataulakhanov F.I., Lobanov A.I., Morozova O.L. - Dynamics of spatially nonuniform patterning in the model of blood coagulation, *Chaos*, 2001, 11(1): 57-70.
  9. Zarnitsina V.I., Pokhilko A.V., Ataulakhanov F.I. - A mathematical model for the spatio-temporal dynamics of intrinsic pathway of blood coagulation. I. The model description, *Thromb. Res.*, 1996, 84(4): 225-236.
  10. Zarnitsina V.I., Pokhilko A.V., Ataulakhanov F.I. - A mathematical model for the spatio-temporal dynamics of intrinsic pathway of blood coagulation. II. Results, *Thromb. Res.*, 1996, 84(5): 333-344.
  11. Hassouna H., Quinn C. - Proteolysis of protein C in pooled normal plasma and purified protein C by activated protein C (APC), *Biophys. Chem.*, 2002, 95(2):109-124.

*Гематологический Научный Центр РАМН,  
Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова,  
Москва*