

УДК 577.31

## ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ДИНАМИКА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

© 2002 г. А. В. Похилко, Ф. И. Атауллаханов

Гематологический научный центр Российской академии медицинских наук,  
125167, Москва, Новозыковский проезд, 4а; факс: (095) 212-88-70; электронная почта: pochil@blood.ru

Поступила в редакцию 29.06.2001 г.

С помощью математической модели внутреннего и внешнего путей свертывания крови проанализированы пространственные особенности протекания процесса в системе без перемешивания. Показано, что при превышении порога активации, на активирующей поверхности формируется импульс тромбина, который распространяется в пространстве. Скорость роста сгустка определяется скоростью распространения этого импульса. Передний фронт этой волны формируется кинетикой реакций, образующих петли положительной обратной связи через активацию факторов V и VIII. Задний фронт – быстрый спад активности тромбина после достижения максимума, определяется исчерпанием предшественников факторов свертывания (в частности, протромбина). Исчерпание предшественников приводит также к эффектам увеличения плотности сгустка на краю, и к возникновению повторных волн тромбина. Размер сгустка слабо зависит от величины активирующего сигнала. Он сильно зависит от размеров диффузионной зоны факторов свертывания, которая, в свою очередь, в значительной степени определяется концентрацией ингибиторов свертывания в крови и активностью протеина С.

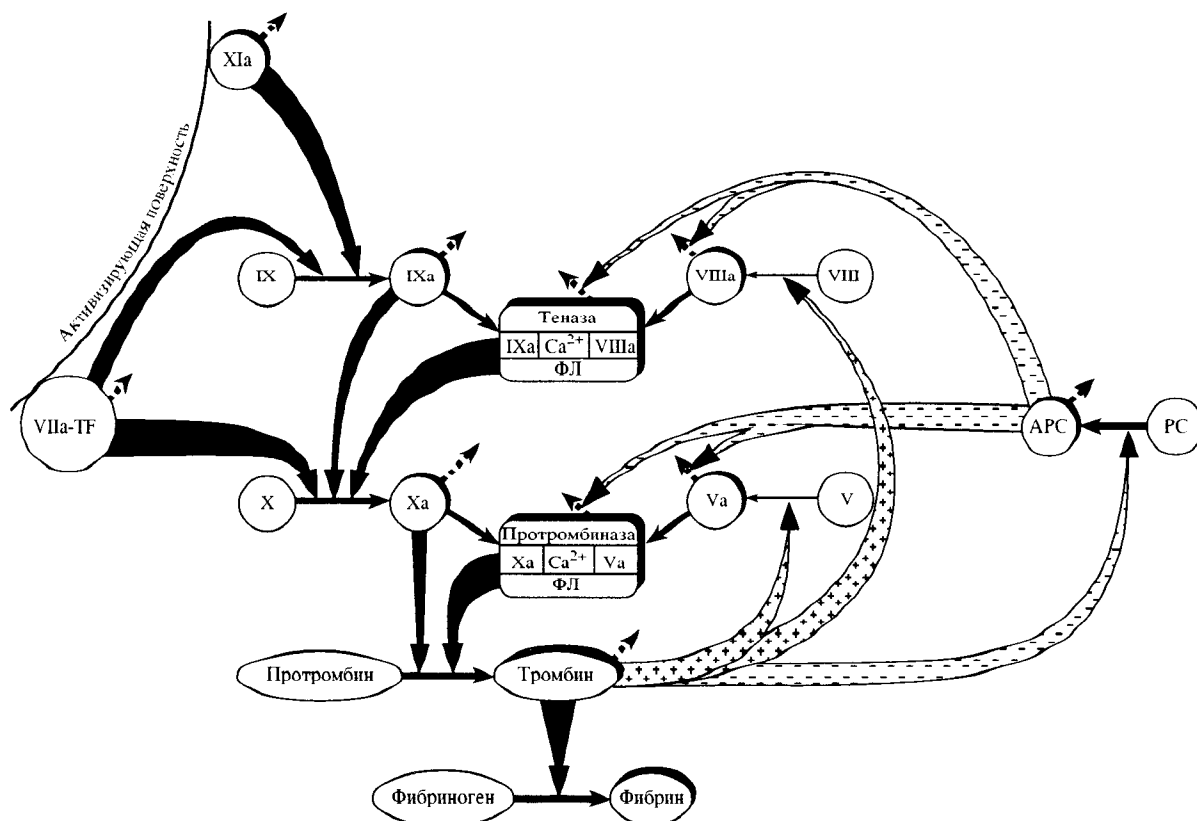
Свертывание крови – один из важнейших защитных процессов в нашем организме. Нарушения свертывания, многие из которых смертельно опасны, сопровождаются разнообразными заболеваниями. Поэтому понимание механизмов свертывания крови имеет важное медицинское значение. Однако интерес к системе свертывания крови сильно выходит за рамки чисто медицинских проблем и представляет большой интерес с общепроцессологической точки зрения. В основе свертывающей системы крови лежит каскад протеолитических реакций. Каскады ферментативных реакций широко распространены в биологии. Механизмы их регуляции пока плохо понятны. Система свертывания относится к числу наиболее исследованных на молекулярном уровне каскадов. Поэтому изучение механизмов регуляции этого каскада может дать важную информацию и для понимания общих принципов регуляции каскадов в биологии.

Сегодня мы довольно много знаем о регуляции этой системы. Этот уровень знаний был достигнут не только благодаря экспериментальным исследованиям, но и при помощи математических моделей. Свертывание должно быть пороговым процессом, чтобы предотвратить тромбозы. С помощью упрощенных математических моделей кинетики свертывания [1, 2] было показано, что существование в системе свертывания порогово-

го поведения связано с наличием в ней положительных обратных связей, осуществляющихся при активации тромбином кофакторов V и VIII. Более полные математические описания кинетики этой системы, включающие в себя уже значительное количество переменных [3, 4], стали возможны благодаря детальным исследованиям отдельных реакций для системы с полным перемешиванием. Появились также математические модели, описывающие кинетику различных частей системы свертывания, хорошо исследованных экспериментально как на реконструированных системах [5, 6], так и для различных тестовых систем [7].

В последнее время стало ясно, что для понимания функционирования системы *in vivo* весьма важен пространственный аспект свертывания крови. Как происходит рост фибринового сгустка на активирующей поверхности? Как показано в феноменологической модели [8, 9] системы свертывания, пространственная динамика процесса может характеризоваться автоволновыми свойствами. В работе [10] привлекается внимание к гидродинамическому аспекту фибринообразования, во многом определяющему пространственную динамику процесса в потоке. В последнее время стали появляться также экспериментальные работы по исследованию различных пространственных аспектов динамики роста сгустка [8, 11]. Тем не менее анализ того, к каким динамическим и пространственным эффектам приводят современные молекулярные представления о

Сокращения. VIIa-TF – комплекс фактора VIIa с тканевым фактором (тромбопластином);  
PC – протеин С; APC – активированный протеин С.



**Рис. 1.** Схема реакций внутреннего и внешнего путей свертывания крови. Запуск каскада реакций свертывания начинается с появления на активирующей поверхности фактора XIa (для внутреннего пути) или комплекса VIIa-TF (для внешнего пути). Превращения веществ обозначены прямыми стрелками, действие ферментов (и их комплексов) – изогнутыми, а реакции связывания активных факторов с ингибиторами – пунктирными стрелками. Стрелками, заполненными знаками + “и” – “обозначены реакции, через которые осуществляются положительные и отрицательные обратные связи. На комплексах протромбиназа и теназа отмечены входящие в них факторы, ионы  $Ca^{2+}$  и фосфолипиды (ФЛ).

свертывании, до сих пор далек от завершения. В данной работе мы постарались восполнить этот пробел настолько, насколько это сегодня возможно. Мы основывались на построенной нами ранее модели [4], которая дала хорошее согласие с экспериментами *in vitro*. Здесь мы уточнили модель [4] с учетом последних экспериментальных данных о пространственной локализации ферментов, активирующих внутренний путь свертывания [11, 12], а также дополнили модель реакциями внешнего пути свертывания. Нашей целью являлось исследование влияния отдельных реакций свертывания, в частности реакций активации, ингибирования, истощения факторов на пространственную организацию процесса роста сгустка.

### ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

Система дифференциальных уравнений (1) (см. Приложение) соответствует схеме биохимических реакций внутреннего и внешнего путей, представленной на рис. 1.

Система свертывания крови представляет собой каскад ферментативных реакций, протекающих в плазме крови при активации факторов (ферментов) свертывания [13, 14]. Факторы обозначаются римскими цифрами. Индексом “a” обозначаются активированные факторы.

Благодаря каскадной структуре, достигается мощное усиление слабого иницирующего сигнала, приводящее к быстрому образованию больших количеств заключительного фермента каскада – тромбина [13, 14]. Тромбин превращает растворимый белок плазмы – фибриноген в нерастворимый полимер – фибрин [13, 15]. Инициация каскада реакций свертывания протекает на чужеродной для кровотока активирующей поверхности по одному из 2 путей: внутреннему или внешнему [13, 14].

Начальные реакции внешнего пути приводят к появлению на активирующей поверхности (поврежденный эндотелий сосудов) комплекса фактора VIIa с тканевым фактором TF – тромбопластином (далее VIIa-TF) [13, 14]. Дальнейший кас-

кад реакций, протекает уже не на поверхности, а в объеме плазмы. Комплекс VIIa-TF активирует фактор X и в меньшей степени – фактор IX. Активный фактор Xa вызывает образование тромбина, делающего фибрин. Последний полимеризуется, образуя фибриновый сгусток.

Начальные реакции внутреннего пути приводят к появлению на активирующей, чужеродной для организма поверхности (например, стекла) фактора XIa [11]. Фактор XIa вызывает активацию фактора IX, фактор IX активирует фактор X, а дальше происходят те же реакции, что и при активации по внешнему пути (рис. 1).

Образование тромбина является центральной биохимической реакцией обоих путей свертывания крови. Он активирует кофакторы V и VIII, что дает начало главным петлям положительной обратной связи в системе свертывания (рис. 1). Активные формы кофакторов VIIIa и Va в присутствии ионов  $Ca^{2+}$  на фосфолипидных мембранах образуют каталитические комплексы с факторами IXa и Xa, называемые теназа и протромбиназа, соответственно (рис. 1). Комплексы теназа и протромбиназа ускоряют производство фактора Xa и тромбина, соответственно, в более чем десять тысяч раз. [16, 17]. Наличие этих сильных положительных обратных связей делает производство тромбина самоускоряющимся. Во избежание полной активации факторов, и, вследствие этого, немедленного сворачивания всей крови, все активные факторы инактивируются ингибиторами, существующими в плазме крови. Важную роль в торможении самоускоряющегося производства тромбина играет реакция активации протеина C (PC) тромбином и последующее расщепление активных кофакторов Va и VIIIa активированным PC (рис. 1). Это главная петля отрицательной обратной связи в системе [14].

Для системы с полным перемешиванием активация моделировалась постоянной концентрацией фактора XIa для внутреннего пути или постоянной концентрацией комплекса VIIa-TF для внешнего пути.

При исследовании системы без перемешивания активация моделировалась локальным скачком концентрации фактора XIa или VIIa-TF на поверхности активатора (см. далее Результаты). Рассчитывалась квазидвухмерная, центрально-симметричная задача: круглый активатор диаметром 0.5 мм был помещен в центре исследуемой области плазмы (круг диаметром 6.5 мм). Эта постановка задачи соответствует экспериментам, в которых тонкий слой в 1 мм перемешиваемой плазмы помещался в чашки Петри и в центре этой области помещался активирующий свертывание стеклянный шарик диаметром 0.5 мм [8]. Процесс распространения активных факторов описывался уравнениями для химических реакций и диффузии факторов, т.е. системой дифференциальных уравнений в частных

производных (см. Приложение). Коэффициенты диффузии факторов свертывания меняются в диапазоне от  $3 \times 10^{-3} \text{ мм}^2 \text{ мин}^{-1}$  для белков молекулярной массы около 60 кДа (например, фактор IX) до  $3 \times 10^{-4} \text{ мм}^2 \text{ мин}^{-1}$  – для высокомолекулярных белков массой около 300 кДа (фактор V) [18]. Поскольку большинство факторов свертывания, используемых в системе (1), имеет молекулярную массу порядка 60–70 кДа (все, кроме факторов Va и VIIIa), при расчетах мы использовали коэффициент диффузии  $3 \times 10^{-3} \text{ мм}^2 \text{ мин}^{-1}$  для всех диффундирующих факторов. Активирующие систему факторы XIa и VIIa-TF полагались локализованными на поверхности активатора (см. об этом подробнее в Результатах).

Активация каскада приводит к образованию тромбина, расщепляющего фибриноген с образованием фибрин-мономеров. Полимеризация фибрина и образование сгустка считались быстрыми процессами [15], поэтому диффузией фибрина пренебрегали. Реакции образования теназы и протромбиназы считались квазистационарными [4]. Значения констант скоростей реакций внутреннего и внешнего путей, измеренные в реконструированных системах, состоящих из очищенных факторов, приведены в Приложении (см. таблицу). Значение константы активации протеина C тромбином  $k_{PC,2}$ , используемое в расчетах (см. таблицу), соответствует скорости протекания этой реакции в плазме *in vitro* в отсутствие тромбомодулина – кофактора этой реакции, расположенного на поверхности клеток эндотелия. В расчетах, посвященном роли отрицательной обратной связи, осуществляющейся через APC, на кинетику и динамику свертывания (рис. 2в и 8в), константа  $k_{PC,2}$  варьировалась, что оговорено отдельно в тексте. Начальные концентрации всех активных факторов были равны 0. Исчерпание предшественников активных факторов введено только для протромбина, начальная концентрация которого равнялась 1000 нМ.

Для расчетов гомогенной кинетики системы дифференциальных уравнений (1) использовался метод LSODA для жестких систем ОДУ [19]. Расчеты пространственной динамики системы (1) производились вложенным методом Рунге-Кутты-Фельберга [19]. Шаг по пространству был выбран таким образом, чтобы дальнейшее его уменьшение не приводило к изменению решения системы. Шаги по времени выбирали автоматически, обеспечивая выполнение условий устойчивости метода и минимизацию реальной вычислительной погрешности. Программы были любезно предоставлены В.И. Зарницыной.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Гомогенная кинетика свертывания

Для более полного понимания механизмов пространственного роста фибринового сгустка,

на первом этапе рассмотрим особенности процесса свертывания в системе с полным перемешиванием.

Как было подробно рассмотрено в работе [4], одним из основных свойств данной системы является пороговое поведение в зависимости от уровня активации (концентрации фактора XIa для внутреннего или VIIa-TF для внешнего пути). При низких уровнях активации активные факторы свертывания быстро инактивируются ингибиторами плазмы крови. После допороговой активации концентрации всех активных факторов, в том числе тромбина, медленно нарастают, достигая своих стационарных значений за времена порядка 20 мин. На рис. 2а показана кинетика образования тромбина по внутреннему пути свертывания крови при низких уровнях активации (кинетика тромбина во внешнем пути качественно похожа). Кривые 1–3 соответствуют допороговым уровням активации, при которых концентрация тромбина незначительно увеличивается с ростом величины активации. Переход в запороговую область меняет кинетику ответа – концентрация тромбина начинает расти с ускорением (кривая 5).

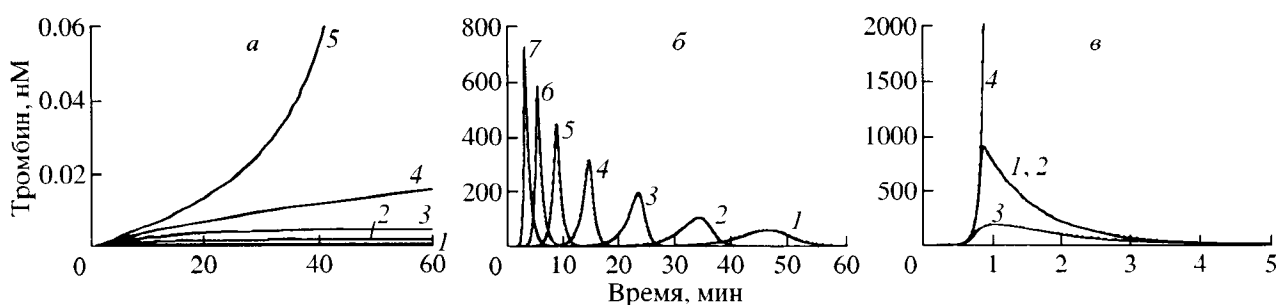
На рис. 3а,б представлена зависимость максимальной концентрации фактора Ха (кривые 1) и тромбина (кривые 2) от уровня активации для внутреннего (рис. 3а) и внешнего (рис. 3б) пути при низких (околопороговых) уровнях активации. Видно, что при приближении к порогу крутизна кривых резко возрастает. При допороговых уровнях активации концентрация тромбина низка: около  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  от концентрации предшественника (см. рис. 3а и 3б кривые 2). При таких концентрациях тромбин производит только следовые количества фибрина и сгусток не образуется.

При превышении порогового уровня активации максимальная концентрация тромбина возрастает скачком на 4 порядка и становится соизмеримой с концентрацией протромбина (1000 нМ).

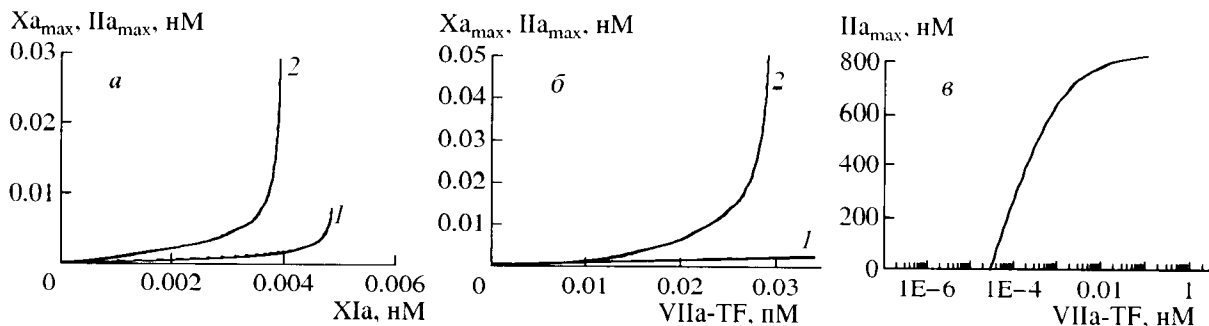
Кинетика производства тромбина при разных уровнях запороговой активации внешнего пути показана на рис. 2б. Концентрация тромбина резко возрастает на 4–5 порядков от допорогового уровня. Такой характер роста приводит к кажущемуся лаг-периоду, когда тромбина очень мало. Такая кинетика производства тромбина достигается за счет положительных обратных связей через активацию кофакторов V и VIII тромбином (см. рис. 1). Как видно из рис. 3а,б, пороговый уровень активации для внутреннего пути составляет 4 пМ фактора XIa для внутреннего пути и 0.03 пМ комплекса VIIa:TF для внешнего пути.

На рис. 3в представлена зависимость максимальной концентрации тромбина от уровня активации при запороговых активациях. Видно, что с уменьшением уровня активации амплитуда тромбина уменьшается, что связано со снижением максимальных концентраций протромбиназы и теназы и с соответствующим уменьшением скорости производства тромбина. Обращает на себя внимание, что при снижении уровня активации амплитуда тромбинового пика падает, но его ширина растет (рис. 2б). Мы полагаем, что это связано с исчерпанием протромбина: чем меньше уровень активации, тем на больший срок хватает запаса предшественника.

Высокие концентрации тромбина существуют недолго. Как видно из рис. 2б, после достижения своего максимума, концентрация тромбина быстро снижается до допорогового уровня. Аналогичную импульсную кинетику имеют и все другие факторы, охваченные петлями положительных обратных связей. Падение концентрации тромбина связано с остановкой его производства и быстрой инактивацией тромбина ингибиторами в плазме. Как показали исследования модели, остановка производства тромбина определяется, в основном, двумя факторами: 1) с исчерпанием предшественника (протромбина), 2) с петлей отрицательной обратной связи, осуществляющейся при



**Рис. 2.** Кинетика тромбина (фактора IIa) в гомогенной системе. а: 1–5 околопороговые уровни активации свертывания по внутреннему пути, равные 1, 2, 3, 4, 5 пМ фактора XIa. б: кривые 1–7 – запороговые уровни активации внешнего пути свертывания, равные 0.04; 0.05; 0.07; 0.12; 0.25; 0.6; 2 пМ комплекса VIIa-TF. в: кинетика тромбина для внешнего пути при уровне активации 0.03 нМ VIIa:TF. 1 – отсутствие реакции активации PC в плазме:  $k_{PC,2} = 0$ ; 2 – нормальный уровень активации PC тромбином в плазме [3]:  $k_{PC,2} = 0.0014 \text{ мин}^{-1}$ ; 3 – повышенная активация PC тромбином:  $k_{PC,2} = 1.4 \text{ мин}^{-1}$ ; 4 – расчет для случая отсутствия исчерпания протромбина в модели для значения  $k_{PC,2} = 0.0014 \text{ мин}^{-1}$ .



**Рис. 3.** Максимальные концентрации факторов при низких (*a, б*) и высоких (*в*) уровнях активации свертывания в гомогенной системе. *a, б* – концентрации фактора Xa (1) и тромбина (Па) (2) при активации внутреннего (*a*) и внешнего (*б*) путей. Под уровнями активации понимается концентрация факторов XIa и VIIa-TF для внутреннего и внешнего путей соответственно. На панели *в* показана концентрация тромбина при активации внешнего пути свертывания крови.

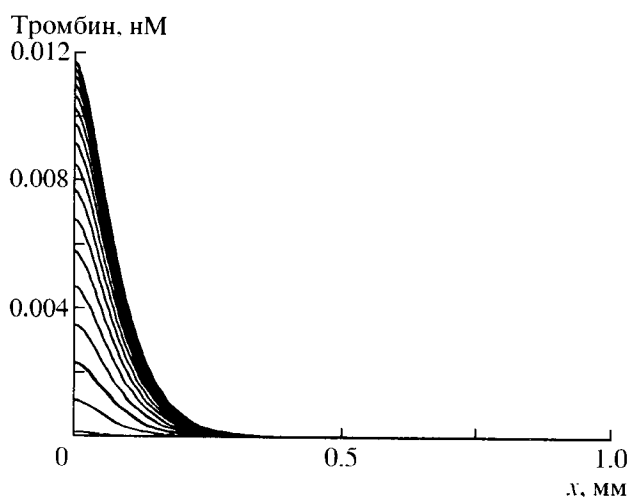
активации PC тромбином и последующим разрушением кофакторов Va и VIIa активированным PC. Вторая причина в нормальной плазме дает очень небольшой вклад. Известно [3], что протеин C активируется тромбином в плазме с очень низкой скоростью:  $k_{PC,2} = 0.0014 \text{ мин}^{-1}$ . На рис 2в показана кинетика образования тромбина в отсутствие активации протеина C (кривая 1), и при скорости его активации в плазме [3] (кривая 2). Видно, что кривые совпадают.

Однако процесс активации протеина C тромбином может значительно (на порядки) ускориться в присутствии тромбомодулина – одного из компонентов клеток эндотелия сосудов [14]. Поэтому для исследования влияния на кинетику тромбина отрицательной обратной связи, осуществляющейся при активации протеина C тромбином, мы варьировали значение константы  $k_{PC,2}$  в

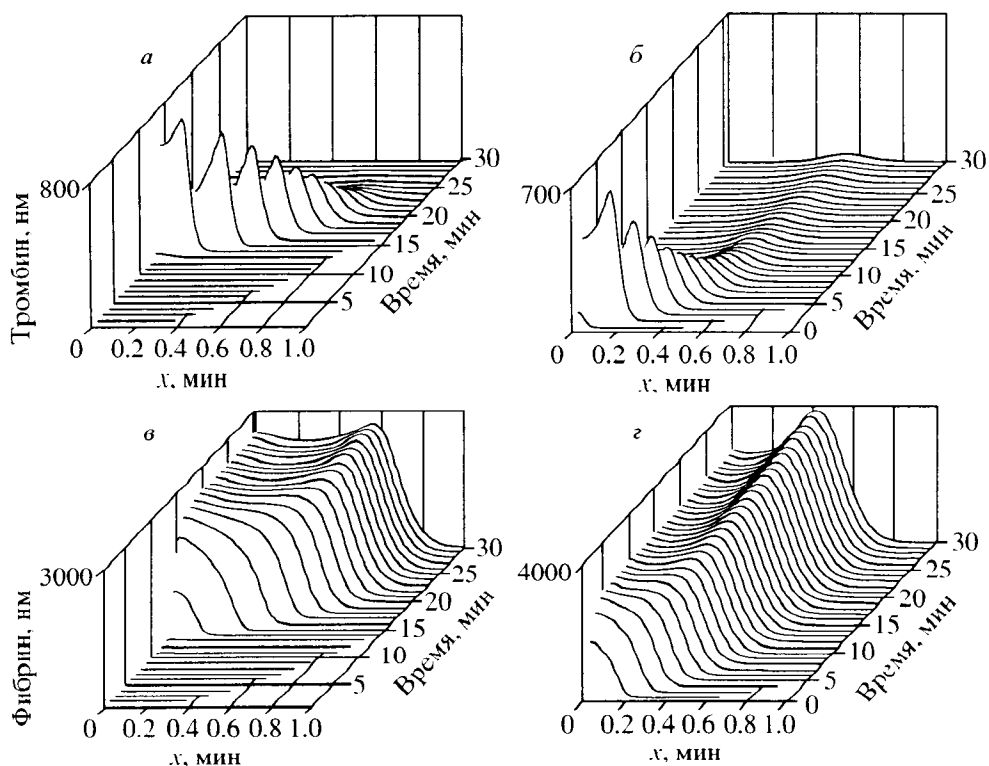
широком диапазоне. На рис. 2в кривая 3 иллюстрирует, как меняется кинетика тромбина в присутствии тромбомодулина ( $k_{PC,2} = 1.4 \text{ мин}^{-1}$ ). Видно, что при высокой константе  $k_{PC,2}$  протеин C оказывает заметное влияние на амплитуду тромбина. На том же рисунке 2 в кривая 4 показывает кинетику тромбина для значения  $k_{PC,2} = 0.0014 \text{ мин}^{-1}$ , если в модели отсутствует исчерпание протромбина. Из сравнения кривых 2 и 4 видно, что при слабых уровнях активации PC, которое наблюдается в плазме *in vitro*, исчерпание протромбина является основным фактором, ограничивающим рост концентрации тромбина.

### Пространственная динамика свертывания крови

**Распространение активных факторов от активатора в глубь плазмы.** Теперь рассмотрим пространственную динамику распространения активных факторов от границы активатора в глубь плазмы в системе без перемешивания в модели (1) (Приложение). Первым активным фактором в модели (1) для внутреннего пути является фактор XIa, а для внешнего – комплекс VIIa-TF. Будем понимать под величиной активации стационарную концентрацию этих “входных” в систему факторов на поверхности активатора (расстояние от границы активатора:  $x = 0$ ). Так же, как и в гомогенном случае, при изменении величины активации поведение системы свертывания в пространстве характеризуется наличием порога по активации для инициации свертывания [4]. Для низких, подпороговых уровней активации профили распространения факторов от активирующей поверхности имеют диффузионный вид. При этом благодаря наличию процессов диффузии и ингибирования концентрации активных факторов плавно спадают по мере удаления от активатора. На рис.4 показаны профили распространения тромбина в пространстве при допороговой активации внешнего пути.



**Рис. 4.** Профили распространения тромбина радиально от границы активатора в системе без перемешивания при допороговой активации внешнего пути свертывания крови, равной 0.3 пМ для стационарной концентрации комплекса VIIa-TF на границе активатора ( $x = 0$ ). Кривые проведены через 2 мин начиная с  $t = 1$  мин.



**Рис. 5.** Профили распространения тромбина (*а, б*) и фибрина (*в, г*) при активации внутреннего (*а, в*) и внешнего (*б, г*) путей свертывания крови в системе без перемешивания. Уровень активации равен 1 нМ (для стационарной концентрации факторов XIa или VIIa-TF на поверхности активатора для внутреннего или внешнего путей). Кривые проведены с интервалом времени 1 мин. *x* – расстояние от границы активатора.

Когда величина активации становится выше порога, пространственная динамика факторов, охваченных петлями положительных обратных связей, меняется драматически. На рис. 5*а* и 5*б* показана пространственная динамика распространения тромбина при запороговой активации внутреннего и внешнего путей свертывания соответственно. Из сравнения рис. 4 и рис. 5*а,б* видно, что при запороговой активации концентрация тромбина возрастает на 4–5 порядков по сравнению с допороговой активацией (см. разницу в масштабах на рис. 4 и 5*а,б*). Это резкое нарастание концентрации тромбина происходит первоначально только в непосредственной близости от границы активатора. При этом, как и в гомогенном случае, концентрация тромбина увеличивается на 4–5 порядков, быстро достигая своей максимальной амплитуды, затем начинает падать. В то же время идет диффузия тромбина и других факторов вглубь плазмы. По мере удаления от активатора, во всех точках пространства, в которых концентрация диффузионно распространившихся активных факторов IXa, Xa, тромбина достаточно высока для запуска свертывания, начинается производство тромбина, ускоряющего свое же собственное производство за счет активации V и VIII и сборки протромбиназы и теназы. В ре-

зультате этого возникает концентрационная волна образования тромбина, имеющая вид бегущего импульса. Эта волна быстро движется по зоне диффузионного распространения иницирующих факторов (рис. 5*а,б*). Кинетика образования тромбина в каждой точке пространства является подобием гомогенной кинетики тромбина (см. рис. 2*б*). Вслед за тромбином быстро распространяется фронт растущего фибринового сгустка (рис. 5*в* и 5*г*). Из сравнения рис. 5*а* и 5*б* видно, что при инициации свертывания по внешнему пути начинается практически сразу, тогда как по внутреннему пути время появления ощутимых концентраций тромбина достигает 10 мин (при одинаковой величине активации). Это связано с тем, что в цепочке каскада реакций внутреннего пути есть медленная реакция активации фактора X фактором IXa ( $k_{10,9} = 0.0033 \text{ мин}^{-1}$ , [16]), что приводит к существенному замедлению работы каскада реакций свертывания по сравнению с активацией внешнего пути (см. константы реакций в табл. Приложения).

Амплитуда тромбинового импульса и скорость его движения падает по мере удаления от границы активатора. Это связано с падением скорости производства тромбина, определяемой концентрациями протромбиназы и теназы, огра-

