

ТРОМБОЗ ГЕМОСТАЗ И РЕОЛОГИЯ

**НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ**

**№2
2003**

Т
ромбоз
Г
емостаз
Р
еология

ПРОБЛЕМА

СИСТЕМЫ БЕЗ ПЕРЕМЕШИВАНИЯ: НОВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ДИНАМИКИ РОСТА ФИБРИНОВОГО СГУСТКА

Е.И. Синаурдзе, Р.И. Волкова, Ю.В. Красоткина, М.В. Ованесов, Ф.И. Атауллаханов,
Лаборатория физической биохимии системы крови, Гематологический научный центр РАМН, Москва

SYSTEMS WITHOUT STIRRING: A NEW MODEL FOR STUDYING THE SPATIAL DYNAMICS OF FIBRIN CLOT GROWTH

E.I. Sinauridze, R.I. Volkova, Yu.V. Krasotkina, M.V. Ovanesov, F.I. Ataulakhanov
Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences

Работа была частично поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований № 97-04-49223 и № 00-04-48855.

A new experimental approach is proposed that makes it possible to study the spatial organization of blood coagulation and the role of diffusion in the dynamics of fibrin clot growth. The approach is based on the use of nonstirred systems. The spatiotemporal dynamics of fibrin clot growth was analyzed (i) in citrated plasma from healthy donors and fibrinogen solutions where thrombin was allowed to diffuse and (ii) in recalcified plasma from healthy donors and patients with severe hemophilia A or B locally activated with fibroblast thromboplastin (by the extrinsic pathway). Experiments with fluorescently labeled thrombin demonstrated that the clots formed were permeable for molecules of this enzyme. Despite continuing thrombin diffusion, the clot stopped growing in plasma in some time after the start of thrombin diffusion. In recalcified plasma from healthy donors and patients with hemophilia A or B, the different dynamics of clot growth were observed. The clot grew much slower in hemophilic plasmas, and its gradually sloping front was typical of a diffusion-driven process. In contrast, in normal plasma, the steep front of fibrin propagation in space resembled a running step. The data are discussed in terms of the previously proposed autowave hypothesis of blood coagulation. In this hypothesis, the main role in the spatial expansion of the clot is played by reactions of the intrinsic pathway, or, more specifically, by factor XI activation by thrombin.

Ключевые слова: свертывание крови — рост фибринового сгустка — пространственная динамика — внешний путь свертывания крови — гемофилия — плазма — фибриноген.

Key words: blood coagulation — fibrin clot growth — spatial dynamics — extrinsic pathway of coagulation — hemophilia — plasma — fibrinogen.

Сокращения: АМС — 7-амино-4-метилкумарин; АТIII — антитромбин III; ВОС-Ala-Pro-Arg-АМС — *t*-N-бутоксикарбонил-аланил-пролил-аргинил-7-амино-4-метилкумарин; FITC — флуоресцеинизотиоцианат; FITC-тромбин — тромбин, меченный флуоресцеинизотиоцианатом.

ВВЕДЕНИЕ

Основная функция системы свертывания крови — остановить кровотечение в месте повреждения сосуда путем образования плотного фибринового сгустка. В настоящее время процессы, участвующие в свертывании, изучены достаточно детально. Известно, что система свертывания крови представляет собой каскад последовательных реакций, где каждая предыдущая стадия приводит к возникновению активного фермента (сериновой протеазы), катализирующего протекание реакции на следующей ступени каскада. Ключевую роль в системе играет тромбин, завершающий фермент каскада, который непосредственно превращает фибриноген в нерастворимый фибрин.

Описанные выше процессы подробно изучены *in vitro* в системах с полным перемешиванием [1]. В этих условиях концентрации отдельных метаболитов или их комплексов одинаковы в каждой точке пространства образца. Хорошо известно, что без специальных, предупреждающих свертывание, добавок кровь вне сосудов организма всегда свертывается. В условиях полного перемешивания это свертывание генерализовано, то есть идет равномерно во всем объеме образца крови

или плазмы. В организме в норме, наоборот, образующийся тромб всегда имеет ограниченный размер и локализован строго в месте повреждения сосуда. Здесь отсутствует усреднение концентраций участников процесса по объему. При этом начинают играть существенную роль некоторые факторы и реакции, влияние которых в системах с перемешиванием было незначительным [2]. Принципиально меняется динамика роста сгустков. В изучение того, как происходит рост и остановка роста тромба в пространстве, необходимо включить в рассмотрение диффузионные процессы распространения активных факторов и ингибиторов свертывания, вклад которых в динамику процесса тромбообразования в системах с перемешиванием пренебрежимо мал.

Настоящая работа посвящена изучению роли диффузионных процессов в образовании фибринового сгустков в плазме в отсутствие перемешивания. *In vivo* скорость кровотока в мелких сосудах мала. В силу ламинарности потока и наличия профиля скорости течения жидкости в таком сосуде, медленнее всего кровь протекает у сосудистой стенки [3]. Первой реакцией сосуда на повреждение является его сжатие (вазоконстрикция), что в узких капиллярах может привести к дальнейшему уменьше-

нию скорости, а иногда к полной остановке кровотока [4]. Таким образом, хотя ситуация с полным отсутствием перемешивания является «идеализацией», и практически не встречается в организме в чистом виде, подобная модель безусловно оправдана, т.к. только она позволяет получить новую интересную информацию, недоступную ранее в стандартных экспериментальных системах.

В работе исследована динамика роста сгустков при диффузии тромбина в растворе фибриногена или цитратную плазму, а также рост сгустков в рекальцифицированной плазме при активации свертывания по внешнему пути. В первом случае, работа ферментативного каскада в системе выключена из-за отсутствия ионов свободного кальция, но сгусток образуется, так как в образец постоянно диффундирует активный тромбин. Во втором — образование тромбина в плазме происходит в результате работы реакций каскада свертывания, запускаемого по внешнему пути тканевым фактором фибробластов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В опытах была использована свободная от тромбоцитов плазма здоровых доноров и пациентов с гемофилией А или В, приготовленная их крови взятой на стандартном 3,8% растворе цитрата натрия (рН = 5,5) в соотношении кровь: консервант = 9:1 и центрифугированная сначала 20 минут при 2400 г, а затем еще 5 минут при 10000 г.

После стабилизации рН в плазме на уровне 7,2–7,4 путем инкубации с молочной кислотой [5], в плазму добавляли анид натрия (до конечной концентрации 10 мкМ) и выдерживали ее 16–18 часов при 37°С для инактивации факторов контактной фазы, активированных в процессе забора крови. В опытах с активацией свертывания по внешнему пути плазму перед экспериментом рекальцифицировали добавлением 1 М раствора хлорида кальция (20 мкл на 1 мл плазмы). Концентрация свободного кальция в плазме после рекальцификации составляла 5 мМ.

Было показано, что процедуры подготовки не изменяют принципиально времен свертывания плазмы в стандартных коагулологических тестах. Так в полностью обработанной плазме величины тромбинового, протромбинового и активированного частичного тромбопластинового времени (ТВ, ПВ, АЧТВ) составляли $14,0 \pm 1,0$ сек ($n=3$), $17,0 \pm 2,0$ сек ($n=5$) и $35,0 \pm 3,0$ сек ($n=5$) при норме 15–18 сек, 12–20 сек и 38–55 сек, соответственно [6].

Обедненную АТ III плазму получали с помощью аффинного иммуносорбента с антителами козы к АТ III человека, иммобилизованными на *BrCN-Sepharose 4B* («Pharmacia», Швеция) [7], которые были любезно предоставлены С.П. Домогатским (Институт экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ). После однократного пропускания 1 мл плазмы через 0,5 мл аффинного сорбента концентрация АТ III в ней, измеренная с помощью иммуноферментного анализа [7], составляла не более 5% от исходной.

Для активации свертывания по внешнему пути были использованы полистироловые пластинки, покрытые монослоем фибробластов [8]. Культура фи-

бробластов легочной ткани эмбриона человека (линия *LECN-240*, Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН) была выращена в Институте иммунологии Министерства здравоохранения России и любезно предоставлена нам Л.И. Ульяновой.

В работе использовали бычий тромбин («Merck», Германия), а также приготовленный на его основе по известной методике FITC-тромбин [9]. Хроматография растворов FITC-тромбина на *Sephadex G-25* показала, что в исходном препарате, а также в растворах FITC-тромбина в процессе хранения отсутствует примесь отщепившихся малых молекул FITC.

Тромбин, FITC-тромбин и фибриноген свободный от плазмина и плазминогена («Sigma», США) растворяли в 50 мМ имидазольном буфере с рН=7,4, содержащем 145 мМ хлорида натрия и 5% альбумина человека. Флюорогенный субстрат специфичный по отношению к тромбину Boc-Ala-Pro-Arg-AMC [10] был синтезирован в Институте биологической и медицинской химии РАМН (Россия). В работе была использована низкотемпературная агароза с температурой желатинизации 38°С («Fluka», Германия), полиэтиленгликоль 6000 («Serva», Германия), хлорид кальция, FITC и AMC («Sigma», США). Все остальные реактивы (степени очистки ч.д.а. и х.м.) были отечественного производства.

Измерение активности тромбина и FITC-тромбина
Концентрации тромбина и FITC-тромбина рассчитывали по скоростям отщепления AMC от специфического флюорогенного субстрата ($\lambda_{\text{exc}}=380$ нм; $\lambda_{\text{em}}=440$ нм) [10]. Количественную калибровку сигнала проводили по раствору AMC с концентрацией 1 мкМ.

Излучение роста фибринового сгустка в пространстве
Рост сгустка в пространстве при диффузии тромбина в цитратную плазму исследовали в полистироловой камере, состоящей из двух отсеков (рис. 1а). Отсеки были разделены полиэтилентерефталевой мембраной с диаметром пор 3 мкм. Объем каждого отсека был равен 300 мкл, высота — 1 мм. Один из отсеков заполняли цитратной плазмой, в которую для подавления возможных конвективных потоков добавляли расплав низкотемпературной агарозы в конечной концентрации 0,2%. Предварительно было показано, что агароза в указанной концентрации не вызывает активации системы свертывания. Непосредственно перед экспериментом другой отсек камеры заполняли раствором тромбина желаемой концентрации (от 50 до 400 нМ). Инкубацию проводили при 37°С.

Свертывание при активации в рекальцифицированной плазме изучали в камере с одним отсеком (объемом 300 мкл), в которой мембрана была заменена полистироловой пластиной, покрытой монослоем фибробластов (рис. 1б).

Рост сгустка регистрировали по изменению светорассеяния. В каждом эксперименте снимали серию фотографий с интервалом в 1–2 минуты. Регистрацию профилей светорассеяния проводили при помощи установки, позволяющей сохранять изображение любого выбранного участка образца (размером 9,0×6,5 мм) в виде отдельного компьютерного файла. Скорости линейного

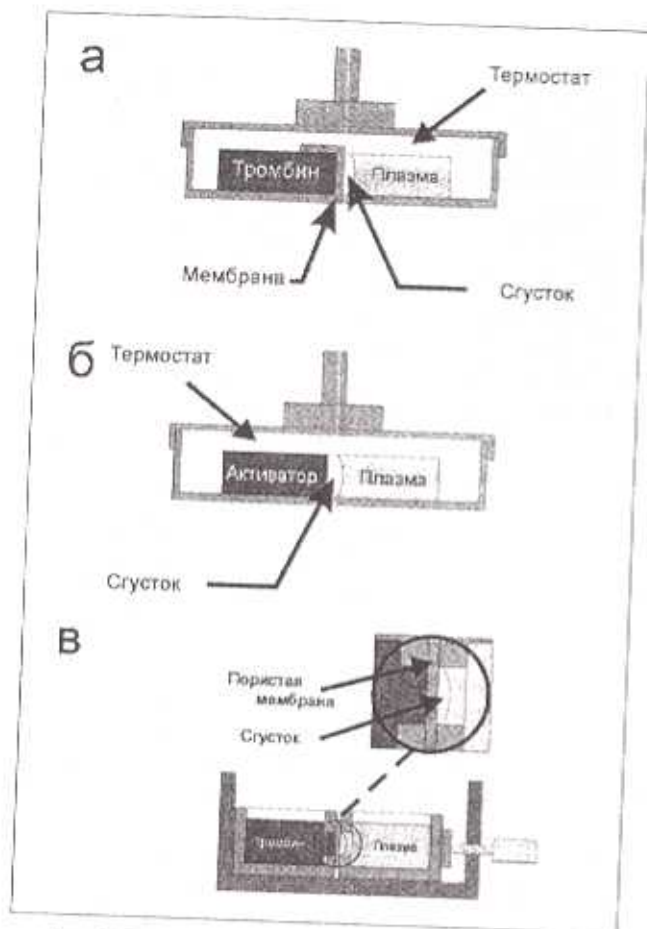


Рис. 1. Схемы экспериментальных камер для изучения пространственной динамики роста сгустков и распределения флуоресцентно меченого тромбина: (а), полистироловая камера для изучения диффузии тромбина или FITC-тромбина в нерекальцифицированную плазму, состоящая из 2 отсеков, разделенных проницаемой мембраной; (б), полистироловая камера с одним отсеком для изучения активации свертывания в рекальцифицированной плазме, одна из боковых стенок которой представляет собой пластиковую поверхность, покрытую монослоем фибробластов, активирующих свертывание по внешнему пути; (в), разборная тефлоновая камера для изучения диффузии тромбина или FITC-тромбина в раствор фибриногена или нерекальцифицированную плазму, состоящая из 2 отсеков, разделенных пористой мембраной.

роста сгустков рассчитывали из полученных профилей как скорость удаления от мембраны (или активатора) точки фронта растущего сгустка, лежащей на уровне полумаксимальной амплитуды сигнала. Пересчет условных единиц интенсивности светорассеяния в единицы концентрации фибрина не проводили, т.к. интенсивность вызываемого сгустком светорассеяния может нелинейно зависеть от степени полимеризации фибрина.

В другой серии экспериментов изучили динамику увеличения веса сгустков. Разборные тефлоновые камеры (рис. 1в) состояли из двух отсеков, разделенных той же пористой мембраной. Объем добавляемых в отсеки проб составлял 0,6 мл. Конструкция камер позволяла извлекать содержимое каждого отсека, а также образовавшийся на мембране при диффузии тромбина сгусток

в различные моменты времени после начала инкубации. После отмытия от растворимых белков плазмы сгусток растворяли в 0,6 мл 0,2 М раствор гидроксида натрия. Вес сгустка затем был пересчитан из объема этого раствора и концентрации белка в нем, которая определялась биуретовым методом

Изучение диффузии флуоресцентно меченого тромбина через мембрану и проницаемости фибринового сгустка для FITC-тромбина

Для изучения диффузии тромбина в буферный раствор или цитратную плазму измеряли пространственное распределение FITC-тромбина в субстратном отсеке по его флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 490 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{иссл}} = 520 \text{ нм}$). Регистрацию осуществляли на той же экспериментальной установке, осекая образец снизу светом нужной длины волны. Сигналы флуоресценции пересчитывали в соответствующие концентрации FITC, с помощью количественной калибровки по 0,1 мкМ раствору флуоресцеина.

Проницаемость фибриновых сгустков для FITC-тромбина была оценена в разборных тефлоновых камерах по интегральной скорости накопления флуоресцентной метки в отсеке с плазмой (рис. 1в). Для этого была подготовлена серия камер, в каждой из которых тромбин диффундировал в цитратную плазму в течение различного времени. После окончания инкубации среднее содержание FITC в плазме каждой камеры было измерено, как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика роста фибринового сгустка в цитратной плазме

На рисунках 2а и 2б приведены характерные серии профилей светорассеяния, наблюдаемые в цитратной плазме при диффузии в нее тромбина (исходные концентрации в ферментном отсеке 50 и 400 нМ, соответственно). В обоих случаях область повышенного светорассеяния локализована у мембраны и имеет четкие пространственные границы, которые характеризуют форму сгустка. В динамике роста сгустка выделяются две стадии. На первой стадии (30–45 минут) происходит увеличение интенсивности светорассеяния и расширение рассеивающей области до 0,3–0,5 мм от мембраны. Следующие 1,5 часа пространственная граница сгустка остается практически постоянной, но интенсивность светорассеяния внутри занятой им зоны продолжает незначительно увеличиваться. Динамика формирования сгустка и его геометрический размер слабо зависят от концентрации тромбина в широкой области исследованных концентраций.

Размер сгустка, однако, существенно увеличивался, если в экспериментах использовали плазму со сниженным до 5% от нормы содержанием АТ III (рис. 2в). В этом случае при концентрации исходного тромбина 200 нМ размер сгустка через 2 часа инкубации достигал примерно 1,2–1,5 мм.

Скорости роста сгустков в стационарной фазе (до остановки) при диффузии двух существенно различных концентраций тромбина (50 и 400 нМ) в нормальную плазму оказались очень близки и составили $3,2 \pm 1,6$

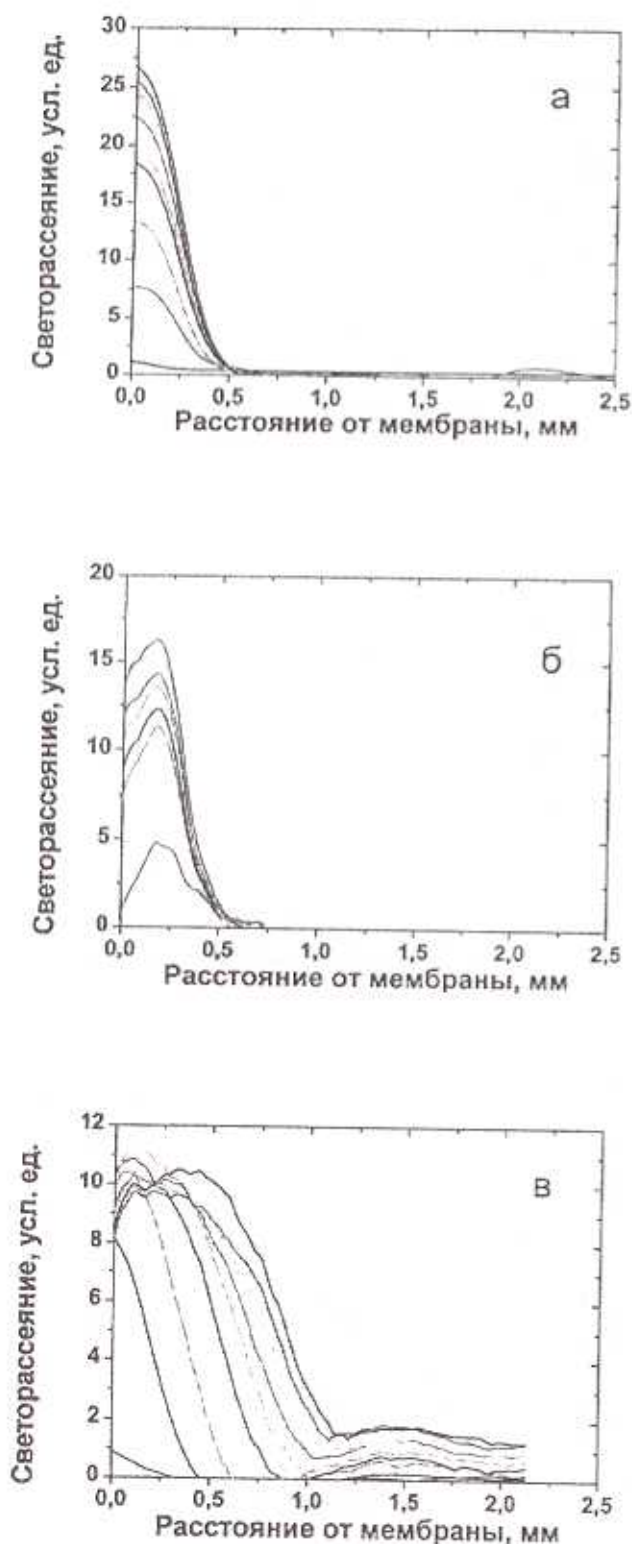


Рис. 2. Динамика изменения светорассеяния в процессе образования фибринового сгустка при диффузии тромбина в цельную некальцифицированную плазму (а, б), а также в цитратную плазму со сниженным до 5% от нормы содержанием антитромбина III (в). Концентрация диффундирующего фермента равна 50 нМ, 400 нМ и 200 нМ (а, б и в, соответственно). Светорассеяние возрастает в ходе инкубации. Первая кривая записана через 2 минуты, все последующие – через каждые 15 минут после начала инкубации.

мкм/мин ($n=5$), тогда как при диффузии 200 нМ тромбина в плазму со сниженным до 5% содержанием АТ III аналогичная скорость была значительно выше ($7,5 \pm 1,3$ мкм/мин, $n=5$), а остановка роста сгустка практически не наблюдалась на протяжении всего времени эксперимента.

Вес тромбов, образующихся в растворе фибриногена или цитратной плазме при диффузии в них тромбина
При диффузии тромбина (126 нМ) в раствор фибриногена (4 мг/мл) сгусток рос без остановки до тех пор, пока весь присутствующий в образце фибриноген не превратился в фибрин (рис. 3, кривая 3 на вставке).

Принципиально отличная картина наблюдалась при диффузии тромбина (40 и 400 нМ) в плазму. Здесь увеличение веса сгустка происходило быстро в первые 1–2 часа после начала диффузии тромбина, а затем практически останавливалось (плато на кривых 1 и 2 рис. 3). При этом вес образовавшихся сгустков в зоне плато составлял примерно 10% от максимально возможного веса сгустка в образце и почти не зависел от концентрации диффундирующего тромбина в широкой области концентраций (кривые 1 и 2 на рис. 3).

Проницаемость фибриновых сгустков для FITC-тромбина

На рисунках 4а и 4б представлены пространственные профили FITC-тромбина при его диффузии в буферный раствор, когда сгусток на мембране отсутствует (рис. 4а), и в плазму (рис. 4б), в условиях, когда этот сгусток образуется. Полученные в обоих случаях картины очень близки. Молекулы меченого белка (как свободные, так и в составе комплексов с ингибиторами плазмы) успевают за время эксперимента (2 часа) продиффундировать на расстояние порядка 1,5 мм, что значительно превышает размер образующегося в плазме сгустка (0,5 мм), который был измерен параллельно.

Опыты по длительной диффузии FITC-тромбина в цитратную плазму, где измерялась средняя концентрация FITC, перешедшего в отсек с плазмой, подтвердили, что образующийся на мембране сгусток не является препятствием для последующей диффузии молекул тромбина в плазменный отсек. На рисунке 4в представлены результаты таких экспериментов на 5 различных плазмах.

Пространственная динамика роста сгустка при активации свертывания в плазме по внешнему пути (тромбопластином фибробластов)

Контакт рекальцифицированной плазмы с монослоем фибробластов богатых тромбопластином, приводит к активации свертывающего каскада по внешнему пути [11]. Характерная серия пространственных профилей светорассеяния, полученная в процессе инкубации плазмы донора при активации свертывания фибробластами, приведена на рисунке 5а. В данном случае образование фибрина начиналось сразу после контакта плазмы с активатором. Интенсивность светорассеяния быстро достигала максимума в области актива-

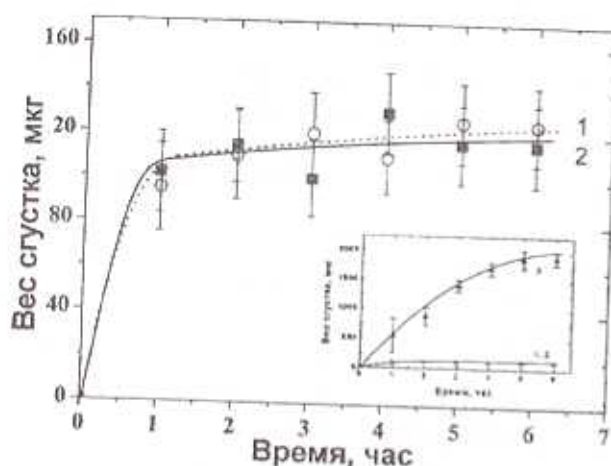


Рис. 3. Возрастание веса сгустка при диффузии тромбина в раствор фибриногена (4 мг/мл) (кривая 3 на вставке) или цитратную плазму (кривые 1 и 2). Концентрация тромбина в ферментном отсеке камеры составляла 40, 400 и 126 нМ для кривых 1, 2 и 3, соответственно. Представлены среднеквадратичные ошибки среднего; $n=5$ или 3 для кривых 1 и 2 или кривой 3, соответственно.

тора, а затем происходило распространение процесса свертывания в объем плазмы. Форма образующегося сгустка напоминала бегущую «ступеньку» с крутым фронтом на границе сгустка и жидкой плазмы. Такая форма профиля фибрина была постоянной в течение всего эксперимента (1 час). Конечный размер сгустка составлял 2,3–2,7 мм.

На рисунках 5б и 5в представлены примеры профилей сгустков в образцах плазмы больных с тяжелыми формами гемофилии А или В (содержание факторов VIII:C или IX:C, соответственно, менее 1%). В данном случае формирование сгустка начинается позже, чем в нормальной плазме, а его рост происходит совершенно иначе. Сгусток практически не растет и объем плазмы. Свертывание локализовано в приактиваторной области, которая не превышает 0,5–1,0 мм. Светорассеяние быстро спадает по мере удаления от активирующей поверхности, что указывает на то, что образование фибрина происходит только вблизи этой поверхности. Форма образующегося сгустка аналогична форме диффузионных кривых пространственного распределения FITC-тромбина (см. рис. 4а и 4б). Скорости роста сгустков составляли $13,2 \pm 2,4$ ($n=12$) и $39,0 \pm 5,4$ ($n=12$) мкм/мин для плазмы пациентов с гемофилией (А или В) или нормальных доноров, соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Диффузия тромбина в раствор фибриногена вызвала постоянный рост сгустка до полного исчерпания субстрата свертывания (см. рис. 3, кривая 3 на вставке). Подобное поведение хорошо согласуется с тем, что в растворе фибриногена отсутствуют ингибиторы активного тромбина. Иная динамика роста сгустка наблюдается, когда тромбин диффундирует в цельную плазму. В этом случае рост сгустка останавливается через 30–40 минут после начала инкубации, а его линейный размер

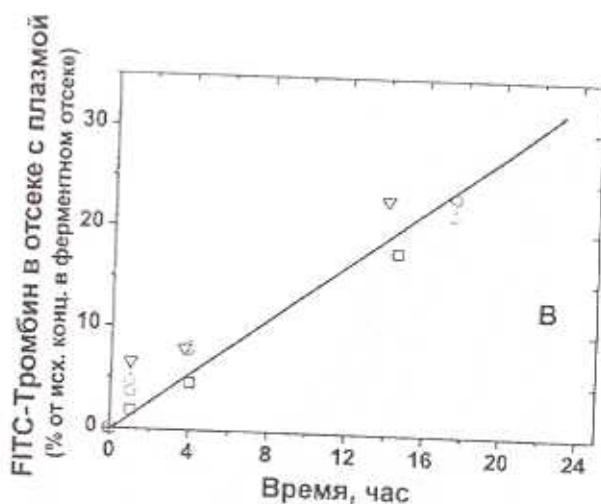
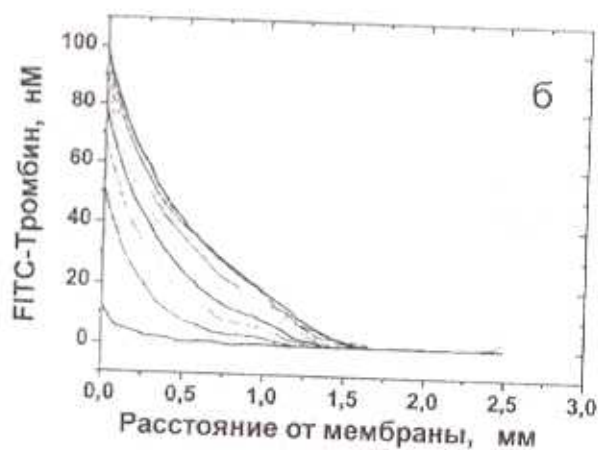
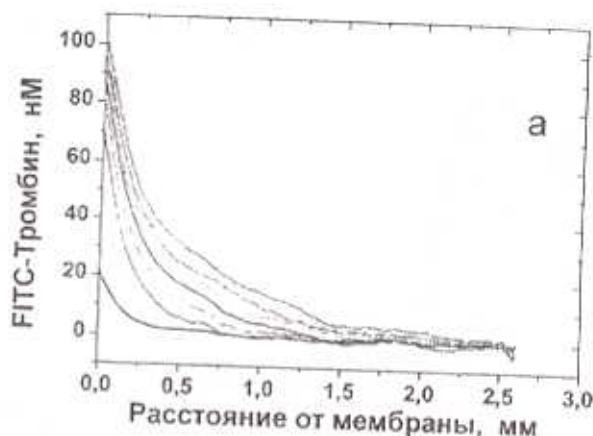


Рис. 4. Пространственное распределение FITC-тромбина в образце при диффузии фермента в буферный раствор (а) или плазму (б), а также суммарное накопление FITC-тромбина в отсеке с цитратной плазмой в процессе его длительной диффузии (в). Концентрация исходного фермента 200 нМ (а и б), а на панели (в) 400 нМ. Точки разной формы на панели (в) соответствуют 5 разным экспериментам. Концентрация FITC возрастает со временем инкубации. Первая кривая записана через 2 минуты, а все последующие — через каждые 15 минут после начала инкубации.

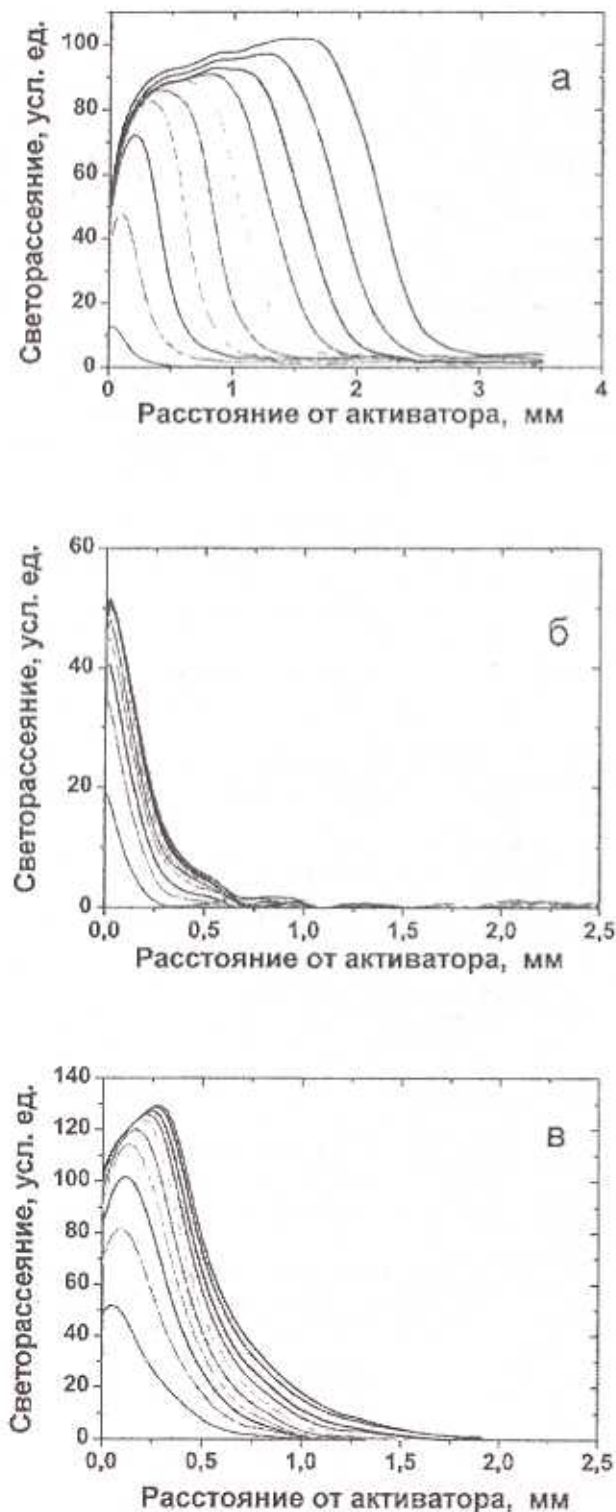


Рис. 5. Динамика изменения светорассеяния в результате роста сгустков при активации свертывания в рекальцифицированной плазме по внешнему пути (тромбопластином фибробластов): (а) в плазме здорового донора; (б) в плазме пациента с гемофилией А; (в) в плазме пациента с гемофилией В. Содержание факторов VIII или IX в плазмах пациентов с гемофилией А или В, соответственно, составляло менее 1%. Светорассеяние возрастает в ходе инкубации. Первые кривые записаны через 2 минуты, а все последующие — через каждые 6 минут инкубации.

не превышает 0,5 мм (см. рис. 2а и 2б).

Анализ причин остановки роста сгустков в плазме показал, что она не связана с возможностью превращения активного α -тромбина в результате ограниченного протеолиза в неактивный по отношению к фибриногену γ -тромбин или с работой фибринолитической системы, способной растворять вновь образующийся сгусток. Скорость самопроизвольного перехода α -тромбина в γ -тромбин очень низка и не может существенно повлиять на концентрацию активного α -тромбина [12]. Отсутствие влияния фибринолитической системы было ранее доказано в работе [5], где было показано, что динамика роста сгустков в присутствии ингибиторов системы фибринолиза не изменяется.

Не связана эта остановка и с прекращением поступления тромбина в субстратный отсек из-за возникновения на мембране плотного фибринового сгустка. Это следует из опытов по диффузии FITC-тромбина (см. рис. 4). Из рисунка 4 видно, что расстояние, на которое может диффузией распространиться метка за 2 часа составляет около 1,5 мм. Сравнение этой диффузии в присутствии и отсутствии сгустка на мембране (см. рис. 4а и 4б), а также постоянное накопление FITC-тромбина и его комплексов в субстратном отсеке на протяжении длительного времени инкубации (см. рис. 4в) подтверждают, что образующийся на мембране сгусток проницаем для молекул диффундирующего фермента.

Логично предположить, что наблюдаемая остановка роста сгустка обусловлена инактивацией тромбина ингибиторами, имеющимися в плазме крови, основным из которых является АТ III [13]. Это подтверждают опыты, в которых тромбин диффундирует в плазму, содержащую не более 5% от нормальной концентрации АТ III. Здесь фибриновый сгусток вырастает до $1,5 \pm 0,2$ мм ($n=5$), причем остановки его роста за время эксперимента не происходит (см. рис. 2в).

Слабая зависимость роста сгустка от концентрации диффундирующего тромбина связана, по-видимому, с тем, что ингибиторы тромбина присутствуют в плазме в большом избытке, по отношению к любой из концентраций тромбина, которые были исследованы (реальные концентрации тромбина в субстратном отсеке равны концентрации исходного тромбина в ферментном отсеке только непосредственно на поверхности мембраны, а при удалении от нее быстро падают на два порядка и более).

Таким образом, полученные результаты по динамике роста сгустков при диффузии тромбина в цитратную плазму в основном определяются взаимодействием тромбина с его ингибиторами, присутствующими в плазме.

При активации свертывания в плазме доноров, в которой восстановлена физиологическая концентрация ионов свободного кальция, сгусток растет иначе, чем при диффузии тромбина в цитратную плазму (см. рис. 5а и 2б, соответственно). В наших экспериментах свертывание инициировалось по внешнему пути фибробластами, на поверхности которых находится тканевой фактор [11]. Процесс свертывания, начавшись на поверхности активатора, удаляется вглубь плазмы на расстоя-

ние 2,3–2,7 мм, что значительно превышает расстояние, на которое распространяется тромбин при свободной диффузии (см. рис. 4б).

Активирующий тканевой фактор прочно связан с поверхностью и в раствор не диффундирует [11]. Если тромбин образуется только вблизи поверхности активатора, а уже затем распространяется в объем образца диффузией, то эта ситуация ничем не должна отличаться от той, что мы наблюдаем в опытах по диффузии тромбина через мембрану в цитратную плазму. Источником активного фермента в таком случае является только активирующая поверхность. Однако, форма профиля растущего сгустка в случае активации свертывания и рекальцифицированной плазме существенно круче, чем диффузионный профиль сгустков, растущих под действием тромбина в цитратной плазме (см. рис. 2б и 5а). Крутой профиль сохраняется на протяжении всего времени эксперимента (2 часа). Объяснить это можно только, предположив, что в случае активации свертывания в рекальцифицированной плазме тромбин образуется не только на поверхности активатора. В работе [14] было предположено, что молекулы тромбина, которые, в отличие от активаторных молекул, могут диффундировать в объем образца, вызывают собственную автокаталитическую наработку в тех точках пространства, куда пришел движущийся фронт тромбина. Это могло бы объяснить и более крутую форму профиля растущего сгустка, и большую скорость его роста (3,2 и 39,0 мкм/мин для нормальной донорской плазмы при диффузии тромбина через мембрану или при активации свертывания в рекальцифицированной плазме фибробластами, соответственно).

Обеспечить автокаталитическую наработку тромбина в пространстве могут реакции внутреннего пути каскада в случае, если диффундирующий тромбин способен активировать фактор XI. В настоящий момент в литературе существует дискуссия на тему о скорости реакции активации фактора XI тромбином в организме [15–18]. Однако математические модельные расчеты показали, что даже очень незначительной скорости протекания этой реакции достаточно для того, чтобы такой автокатализ привел к возникновению бегущей по пространству самоподдерживающейся тромбиновой автоволны [2].

Таким образом, фаза пространственного роста сгустка может определяться реакциями внутреннего пути свертывания и, в частности, реакцией активации фактора XI тромбином, вне зависимости от того, по какому из путей (внутреннему или внешнему) свертывание было активировано. Фаза пространственного роста сгустка будет замедлена при любых нарушениях в каскаде внутреннего пути. Это подтверждают опыты по активации свертывания фибробластами в плазмах больных с тяжелыми формами гемофилии А или В (см. рис. 5б и 5в, соответственно). В таких плазмах сгусток образуется только в приактиваторной зоне, не превышающей 0,5 мм, а динамика его роста очень похожа на динамику образования сгустков при диффузии тромбина в цитратную плазму (см. рис. 2а и 2б).

Тяжелые формы гемофилии характеризуются острым дефицитом одного из факторов внутреннего пути свертывания (содержание факторов VIII или IX менее 1% от нормы). Это не мешает нормальной активации свертывания по внешнему пути (тромбопластическое образование тромбина в объеме плазмы вдали от активатора. Тромбин, образовавшийся на поверхности активатора в гемофилических плазмах, затем распространяется в объем плазмы только диффузионно, как и в опытах по диффузии тромбина в цитратную плазму. В результате образуются схожие по форме и размеру сгустки. Таким образом, все полученные результаты хорошо согласуются с ранее высказанной гипотезой об автоволновом распространении тромбина при активации свертывания в рекальцифицированной плазме [14].

ЛИТЕРАТУРА

1. Mann, K.G. *Thrombosis and Haemostasis. // State of the Art. — 1999, 82, 165-174.*
2. Zarnitsina, V.I., Pokhilko, A.V., Ataulakhanov E.I. // *Thromb. Res. — 1996, 84, 333-344.*
3. Вицлеб, Э. / В кн.: *Физиология человека (под ред. Шмидта, Р., Телса, Г.), издание 2, т. 2, М., Мир, 1996, с. 501-502.*
4. Вайс, Х., Элькманн, В. / В кн.: *«Физиология человека» (под ред. Шмидта, Р., Телса, Г.), издание 2, т. 2. — М., Мир, 1996, с. 431.*
5. Sinauridze, E.I., Vulkova, R.I., Krasotkina, Yu.V., et al. // *Biochim. Biophys. Acta — 1998, 1425, 3, 607-616.*
6. Смоляницкий, А.Я. / В кн.: *«Справочник лабораторные методы исследования в клинике» (под ред. проф. Меньшикова, В.В.). — М., Медицина, 1987, с. 155-170.*
7. Нурбаев А.В. Особенности развития фибринового сгустка в плазме крови *in vitro*. // *Дисс... канд. биол. наук. — М. — 1997 — с. 43-46.*
8. Grabowski, E.F., Zuckerman, D.B., Nemerson, Y. // *Blood. — 1993, 81, 3265-3270.*
9. Hudson, L., Hay, T.C., «Practical Immunology» / 3rd edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989, pp. 34-35.
10. Kawabata, S., Miura, T., Morita, T., et al. // *Eur. J. Biochem. — 1988, 172, 1, 17-25.*
11. Nemerson, Y. In: «Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice» / (Coleman, R.W., Hirsh, J., Marder, V.J., Salzman, E.W., eds.), 3rd edition, Lippincott, Philadelphia, 1994, pp. 81-93.
12. Boissel, J.P., Le Bonniec, B., Rabiet, et al. // *J. Biol. Chem. — 1984, 259, 5691-5697.*
13. Bauer, K.A., Rosenberg, R.D. / In: «Williams Hematology» (Beutler, E., Lichtman, M.A., Coller, B.S., Kipps, T.J. eds.), 5th edition, McGraw-Hill Health Professions Division, New York, London, Tokyo, 1995, pp. 1239-1252.
14. Ataulakhanov, E.I., Guria, G.T., Sarbash, V.I., Volkova, R.I. // *Biochim. Biophys. Acta. — 1998, 1425, 3, 453-468.*
15. Brunnee, T., La Porta, C., Riddigari, S.R., et al. // *Blood. — 1993, 81, 580-586.*
16. Gailani, D., Broze, G.J. Jr. // *Blood. — 1993, 82, 813-819.*
17. Von dem Borne, P.A., Meijers, J.C., Bouma, B.N. // *Blood. — 1995, 86, 3035-3042.*
18. Colman, R.W., Scott, C.F. // *Blood. — 1996, 87, 2089.*