Экспериментальное исследование проницаемости фибринового сгустка в присутствии альбумина

А.В. Николаев¹*a*, Е.И. Синауридзе², В.Н. Буравцев¹

¹ Институт химической физики имени Н. Н. Семенова РАН. Россия, 19991, Москва, ул. Косыгина, д. 4. ² Гематологический научный центр РАМН. Россия, 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4a. E-mail: ^a gentoorion@mail.ru

Статья поступила 29.10.2008, подписана в печать 02.02.2009.

Фибриновые тромбы обладают малой проницаемостью, что влияет на пространственные аспекты процесса свертывания. Между белками плазмы возможны нековалентные взаимодействия. Была проведена проверка гипотезы о накоплении альбумина в тромбах. Показано, что альбумин не связывается с фибриновыми тромбами в заметных количествах, т. е. его наличие не влияет на проницаемость тромба ни при формировании, ни далее. В процессе фильтрации на незакрепленной границе сгустка образуется уплотнение, по проницаемости похожее на компактизированные тромбы.

Ключевые слова: фибрин, альбумин, нековалентные взаимодействия, проницаемость.

УДК: 577.3. PACS: 87.00.00, 87.15.-v, 87.15.Rn.

Введение

Исследования системы свертывания крови (ССК) имеют значение не только для фундаментальной науки, но и для медицинской практики. Гемостаз — сложная система, включающая согласованную работу нескольких подсистем и большого количества различных компонентов [1, 2]. В изучении ССК существенную помощь оказывает математическое моделирование. Несмотря на то, что на сегодняшний день не существует полной модели ССК, учитывающей не только работу каскада факторов свертывания, но также наличие диффузии компонентов и потока крови в сосуде, моделей, успешно описывающих отдельные части системы, существует уже большое количество [2-6]. Модели последнего поколения рассматривают кровь как активную (возбудимую) среду нового типа, а процесс свертывания как реакционно-диффузионную систему в потоке вязкой жидкости [7, 8].

Основной результат работы ССК — формирование непроницаемого для потока тромба в месте повреждения сосуда, состоящего в основном из фибрин-полимера (далее ф.-полимер), но включающего также тромбоциты и другие клетки крови. Однако современные модели либо не учитывают вовсе влияние полимеризующегося сгустка на ток крови, либо учитывают это влияние только путем расчета количества образующихся в данной точке фибрин-мономеров. При этом полимеризацию полагают мгновенной, а влиянием тромба на процессы переноса пренебрегают [6, 7]. При другом подходе тромб рассматривают как недеформируемый и непроницаемый для плазмы сгусток, возникающий пороговым образом после накопления в данной точке определенной концентрации фибрин-мономеров [5]. Таким образом, существующие модели не описывают постепенный переход между вязкой жидкостью (плазмой) и ф.-полимерной сеткой с низкой проницаемостью.

Предшественник фибрина — фибриноген — является большим по размеру белком со сложной структурой (340 кДа, концентрация в плазме в норме 2–4 мг/мл) [1,9]. Тромбин активирует фибриноген, приводя к образованию фибрин-мономера. Полимеризация происходит в несколько этапов, часть из которых до сих пор изучена мало. В результате образуется ф.-полимерная сетка, состоящая из нитей (фибрилл) с приблизительно круглым сечением [9]. Фибриноген и ф.-полимер взаимодействуют не только с белками ССК, в частности показано наличие нековалентного взаимодействия фибриногена с рядом белков плазмы, в том числе с альбуминами [10, 11].

Эксперименты по светорассеянию на ф.-полимерных гелях в реконструированных системах показали, что удельный объем белка в фибрилле составляет примерно $6 Å^3/Да (0.28 г/см^3)$, а отношение объемов воды и белка примерно 4:1 [12]. Приняв среднюю микроскопическую плотность белка равной 1.22-1.35 г/см³ [13], можно оценить массу сетки вместе с водой внутри фибрилл. При полимеризации всего фибриногена в 1 мл плазмы она составит 14-17 мг, а относительный объем сетки не превысит 1.5%. Но проницаемость ф.-полимера, занимающего такой ничтожный объем, будет весьма мала — единицы Дарси (1 Дарси = 10^{-12} м²) [14, 15]. Концентрация плазменного белка альбумина (в норме 35-55 мг/мл) превосходит концентрацию фибриногена в 8-14 раз. Если ф.-полимерная сетка вследствие нековалентных взаимодействий связывает альбумин в количествах, сопоставимых с массой самой сетки, то это может повлиять на динамику роста сопротивления сетки потоку в процессе полимеризации.

Целью настоящей работы была проверка возможности аккумуляции альбумина в ф.-полимерной сетке в количествах, могущих влиять на величину проницаемости сгустка.

1. Материалы и методы исследования

Материалы

В работе была использована донорская плазма, заготовленная на стандартном цитратном антикоагулянте на станции переливания крови ГУ ГНЦ РАМН. Концентрация общего белка в плазме была измерена биуретовым методом и составляла 74±3 мг/мл.

В работе были использованы также растворы: 10% альбумина человека («Биофарма», Киев, Украина), который перед использованием разбавляли до 5% буферным раствором, содержащим 0.01 М НЕРЕЅ и 0.15 М NaCl (рН 7.35), 1%-ный раствор бычьего гемоглобина, приготовленного из эритроцитов по методике [16], L-динитрофенилаланин (Serva, США), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пипер-

азин-2-этаносульфоновая кислота (HEPES) фирмы Fisher Biotech (Fair Lawn, США), CaCl₂ (Sigma, США) и NaCl (особо чистый) («Реахим», Россия).

Формирование фибринового сгустка

Сгустки, свойства которых изучались, были предобразованы из плазмы путем ее рекальцификации. При этом к 2.5 мл плазмы добавляли 50 мкл 1 М раствора CaCl₂. Затем плазму перемешивали в течение 10 с и переносили 2 мл в стеклянную колонку ($d \approx 5.6$ мм, $l \approx 22$ см, сделана из стеклянной пипетки), в которой происходил процесс свертывания. Для фиксации сгустка в колонке, ее нижний конец был затянут капроновой сеткой, укрепленной на трубке липкой лентой, а поверх этого пленкой Parafilm (Sigma, США). В результате в колонке формировался фибриновый сгусток высотой $h_c \approx 8$ см. Сгусток выдерживался в колонке 3-4 ч после начала процесса коагуляции. Затем пленку парафильм удаляли и систему использовали подобно хроматографической колонке (рис. 1). Перед началом эксперимента сгусток промывали 6-8 мл буфера. Высота столба промывающего буфера над верхней границей сгустка поддерживалась постоянной ($L = 10 \pm 0.5$ см, полная высота сгустка и раствора над ним $h_p = 18$ см) перистальтическим насосом. В пробах элюата белок определялся биуретовым методом. Обычно после промывки сгустка 5 мл буфера общий белок в элюате составлял < 0.1 мг/мл. Отмытые сгустки использовали в экспериментах по измерению проницаемости или сорбции на них альбумина из растворов.



Рис. 1. Схема установки для проведения экспериментов по определению проницаемости фибриновых сгустков: 1 — стеклянная трубка (внутренний диаметр 5.6 мм); 2 — сформированный сгусток (объем 2 мл, высота $h_c = 8$ см); 3 — капроновая сетка, поддерживающая сгусток; 4 — резервуар для сбора проб; 5 — резервуар с буфером для промывания сгустка; 6 — перистальтический насос, поддерживающий постоянную высоту столба буфера со сгустком в колонке ($h_p = 18 \pm 0.5$ см); 7 — силиконовая магистраль внутренним диаметром 1 мм

Определение массы фибриновых сгустков

В отдельных экспериментах была определена масса сформированных и промытых фибриновых сгустков. Для этого сгустки (в объеме 2 мл вместе с объемом окружающего буфера) переносились в 2 мл раствора 0.4 н NaOH и растворялись в течение 12 ч при 37°С. Концентрация белка в полученном растворе измерялась биуретовым методом, после чего рассчитывалась общая масса белка в растворенном сгустке.

Измерение проницаемости фибриновых сгустков

Для измерения проницаемости промытые ф.-полимерные сгустки использовались как неподвижная фаза хроматографической колонки. О проницаемости сгустка судили по расходу элюата в зависимости от времени. Фильтрация окрашенного маркера, например гемоглобина, удобна для визуального наблюдения. Если в сгустке присутствуют какие-либо дефекты, то это становится заметно по изменению формы прокрашенной зоны. Для оценки взаимодействия подвижной и неподвижной фаз использовалась зависимость положения фронта нанесенного белка от объема прошедшего элюата. По 0.1 мл растворов: 5%-ного альбумина, 1%-ного гемоглобина, а также 1%-ного раствора низкомолекулярного L-динитрофенилаланина в буфере наносили шприцем с длинной иглой непосредственно на верхнюю границу сгустка (рис. 2, а). Положение полосы в ф.-полимере определяли по центру — «ядру», так как полосы деформировались из-за пристеночных эффектов. На рис. 2 приведена серия фотографий колонки, сделанная в процессе элюирования.



Рис. 2. Фотографии колонки с нанесенным на сгусток раствором 0.1%-ного гемоглобина (0.1 мл) в различные моменты после начала элюции. По мере прохождения гемоглобина через сгусток его полоса уширяется, а рядом со стенкой трубки образуется концентрационный хвост. Положения «ядра» полосы отмечены черными треугольниками и соответствуют прохождению 0, 0.4, 1.4 и 1.55 мл элюата для случаев А, В, С и D соответственно

Характерные скорости элюции составляли от 0.01 до 0.1 мл/мин. Элюат собирался каплями в пробирки Eppendorf. Эффектом испарения капли при ее формировании на конце трубки можно пренебречь, так как прямые измерения показали, что полусферические капли $d \sim 3$ мм (50 мг) теряли 0.2%/мин.

Изучение связывания альбумина с отмытыми сгустками

К отмытым фибриновым сгусткам объемом 2 мл (вместе с окружающим буфером) добавляли по 2 мл 5%-ного раствора альбумина. Таким образом, конечная концентрация альбумина составляла 25 мг/мл, а количество ф.-полимера в 4 мл суммарного объема было равно 7.7 мг. Растворы аккуратно перемешивали 15 мин так, чтобы избежать полного коллапса сгустков, а затем выдерживали при температуре 20–27°С в течение разного времени (от 6 до 24 ч). После этого из каждого образца отбирали по три пробы для определения концентрации оставшегося в объеме альбумина.

2. Результаты и обсуждение

Определение массы фибриновых сгустков, формировавшихся при коагуляции 2 мл плазмы в описанных условиях, показало, что концентрация белка (фибрина) в них составляла 3.85 ± 0.08 мг/мл (n = 3). Полагая, что за 3-4 ч весь фибриноген в плазме превращается в ф.-полимер, можно считать, что концентрация фибриногена в исходной плазме была такой же. Это соответствует разности количеств общего белка в 2 мл исходной плазмы (148 ± 6 мг) и белка, оказавшегося в элюате при промывке (140 ± 6 мг).

В экспериментах по адсорбции альбумина промытые фибриновые сгустки экспонировались в растворе белка 6, 18 или 24 ч. Результаты показали, что для всех времен экспозиции средняя концентрация (n = 3 для каждого образца) общего белка, оставшегося в растворе, соответствовала 25 ± 1 мг/мл. Следовательно, равновесие адсорбции устанавливается быстрее 6 часов, а масса связанного альбумина гораздо меньше массы фибринового сгустка, полученного из 2 мл плазмы (7.7 мг, оценка приведена выше).

Элюцию раствора через сгусток можно рассматривать как фильтрацию через пористую среду, подчиняющуюся закону Дарси:

$$v = \frac{-k_{\rm fp}}{\mu} (\nabla P + \rho g \boldsymbol{e}) = \frac{4Q}{\pi d^2}$$

где e — единичный вертикальный вектор, указывающий вверх, v — удельный расход (скорость в данном эксперименте v < 0), ρ — плотность воды (1000 кг/м³), μ — динамическая вязкость (10⁻³ Па·с), g — ускорение свободного падения, d — диаметр колонки (5.6 мм), Q — расход элюата или скорость фильтрации (мл/мин, Q < 0, как и v), $k_{\rm ip}$ — константа проницаемости (дарси, м²). На границах тромба условия на давление в гидростатическом приближении будут следующими:

$$P|_{x=0} = 0, \quad P|_{x=h_c} = \rho g(h_p - h_c).$$

Решая краевую задачу в области, занимаемой тромбом, получим

$$k_{\rm fp} = -rac{v\,\mu h_c}{
ho g h_p} = -rac{4Q}{\pi d^2}\,rac{\mu h_c}{
ho g h_p}$$

В некоторой части опытов сгусток не выдерживал промывку, что помешало набрать хорошую статистику. В тех же случаях, когда гемоглобин и L-динитрофенилаланин и равномерно продвигались по колонке, были получены очень схожие зависимости объема прошедшего элюата от времени. На рис. З представлен типичный график такой зависимости. Суммарные данные по изменениям скоростей фильтрации (объемного расхода) для трех различных сгустков при увеличении профильтрованного объема приведены в таблице. Для всех образцов константы проницаемости $k_{\rm ip}$, рассчитанные для начального этапа фильтрации, лежали в диапазоне 3 ± 1 дарси.

В эксперименте скорость фильтрации со временем падает. При этом на незакрепленной верхней границе фибринового сгустка образуется визуально наблюдаемое уплотнение параболического профиля глубиной ~ 1 мм. При повреждении уплотнения иглой ($d \sim 2$ мм) расход элюата восстанавливается до прежнего значения (рис. 3). Следовательно, можно предположить, что на верхней границе сгустка возникает слой с малой проницаемостью. Оценка проницаемости этого слоя была проведена путем деления тромба на две области и решением двух



Рис. 3. Типичный график зависимости объема прошедшего элюата от времени фильтрации, полученный в одном из экспериментов. Высота столба жидкости вместе со сгустком поддерживалась постоянной на протяжении всего эксперимента. Стрелкой указан момент прокалывания иглой верхней уплотненной границы сгустка

Снижение скорости фильтрации буферного раствора через фибриновый сгусток при увеличении времени фильтрации*

| Объем прошедшего буферного раствора, мл | Скорость фильтрации Q, мл/мин | | |
|--|-------------------------------|-----------|-----------|
| | Образец 1 | Образец 2 | Образец 3 |
| 2-5 | 0.122 | 0.116 | 0.107 |
| 10-13 | 0.114 | 0.101 | 0.082 |
| 27-30 | 0.020 | | 0.011 |

* Скорость фильтрации Q рассчитана как тангенс угла наклона зависимости объема элюата от времени фильтрации.

краевых задач с условием равенства давления на общей границе. При этом высота уплотнения принята равной 1 мм, а проницаемость нижней области была взята равной проницаемости в начале эксперимента. Оценка дала значение 4.5 мдарси, т.е. на 3 порядка ниже проницаемости тромба в начале эксперимента. Значения проницаемости в 3 ± 1 дарси и 4.5 мдарси совпадают с приведенными в литературе данными, причем последнее из них характерно для «компактизированных тромбов», прошедших через сердце [15, 14]. Стоит отметить, что, согласно теории, тело цилиндрической формы, обладающее проницаемостью в смысле Дарси, будет влиять на поток, перпендикулярный продольной оси, в зависимости от величины безразмерного параметра: $k = \frac{k_{\rm ip}}{a^2}$ (a -диаметр цилиндрического тела) [17]. В диапазоне k > 0.1численные решения для течения практически неотличимы от случая отсутствия тела, а при k < 0.001 от случая полностью непроницаемого тела. Для плазменных тромбов с характерным размером 5 мм это означает, что при $k_{\rm fp} < 2.5 \cdot 10^{-8}$ м² (25000 дарси) сгусток можно считать абсолютно непроницаемым.

Поскольку скорость фильтрации через ф.-полимер в ходе опыта изменялась, то использовать время выхода пика вещества (время задержки), как делают в хроматографии, напрямую нельзя. Поэтому для характеристики взаимодействия сгустков и подвижной фазы использовалась зависимость положения полосы вещества



Рис. 4. Графики зависимостей положения «ядра» полосы вещества от объема прошедшего элюата для бычьего гемоглобина (∇) и L-динитрофенилаланина (ffl). Координата отсчитывалась от нижнего конца трубки вверх. Тангенсы углов наклона прямых были получены с помощью линейного регрессионного анализа и составляли -3.9 ± 0.1 см/мл и -4.1 ± 0.1 см/мл для бычьего гемоглобина и L-динитрофенилаланина соответственно



Рис. 5. Концентрации человеческого альбумина в пробах, элюированных с колонки с отмытым предварительно фибриновым сгустком, в зависимости от объема прошедшего элюата. На колонку было нанесено 0.12 ± 0.01 мл раствора альбумина с концентрацией 50 мг/мл

(в см от верхней границы сгустка) от объема прошедшего элюата (в см³). Эти зависимости для маркеров были линейны, а тангенсы углов их наклона оказались практически одинаковы (-3.9 ± 0.1 см/мл для гемоглобина и -4.1 ± 0.1 см/мл для L-динитрофенилаланина) (рис. 4). За скоростью полосы альбумина можно следить, измеряя концентрацию белка в пробах элюата. На рис. 5 приведен график зависимости концентрации альбумина от объема прошедшего через колонку элюата в одном из экспериментов. Центр пятна альбумина в данном случае вышел примерно на объеме 2 мл, что позволяет полагать, что тангенс угла наклона прямой зависимости положения «ядра» полосы от объема прошедшего элюата для альбумина примерно равен таковым для маркеров. Полный интеграл массы альбумина под графиком равен 5.14 мг. Наблюдаемый концентрационный хвост (рис. 5) можно объяснить деформациями полосы, схожими с теми, что были видны при фильтрации гемоглобина (см. рис. 2).

Проведенные эксперименты показали, что фибриновые сгустки не накапливают альбумин из растворов в количествах, влияющих на изменение проницаемости данных сгустков. Это подтверждается также тем, что при фильтрации через колонку с отмытыми сгустками раствор альбумина проходит с той же скоростью, что и окрашенные хроматографические маркеры (гемоглобин и L-динитрофенилаланин), двигающиеся со скоростью элюирующего буфера. Проницаемость фибриновых сгустков, полученных из плазмы, содержащей 4 мг/мл фибриногена, оказалась равна 3 ± 1 дарси, что хорошо согласуется с данными из литературы. При уплотнении верхней границы сгустка проницаемость этой зоны снижается до 4.5 мдарси, что совпадает с литературными данными для компактизированных тромбов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 07-01-00421-а).

Список литературы

- 1. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания и тромбообразования. Казань, 2000.
- Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. // Pathophysiol. Haemost. Thromb. 2005. 34, N 2-3. P. 60.
- 3. Атауллаханов Ф.И., Лобанова Е.С. // УФН. 2007. **177**, № 1. С. 87.
- Khanin M.A., Semenov V.V. // J. Theor. Biol. 1989. 136. P. 127.
- 5. *Чуличков А.Л., Николаев А.В., Лобанов А.И., Гурия Г.Т.* // Матем. Моделирование. 2000. **12**, № 3. С. 75.
- 6. Лобанов А.И., Старожилова Т.К., Гурия Г.Т. // Математическое моделирование. 1997. 9, № 8. С. 83.
- Ermakova E.A., Panteleev M.A., Shnol E.E. // Pathophysiol Haemost Thromb. 2005. 34. P. 135.
- Zarnitsina V.I., Ataullakhanov F.I., Lobanov A.I., Morozova O.L. // Chaos: Interdisciplinary J.of Nonlinear Sciences. 2001. 11, N 1. P. 57.
- Mosesson M. W. // J. Thromb. Haemost. 2005. 3, N 8. P. 1894.
- 10. London M. // Clinical Biochemistry. 1997. 30, N 2. P. 83.
- Copley A.L., King R.G. // Thrombosis Research. 1972. 1, P. 1.
- Carr M.E., Jr., Hermans J. // Macromolecules. 1978. 11, N 1. P. 46.
- Quillin M.L., Matthews B.W.// Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2000. 56, Pt. 7. P. 791.
- Diamond S.L. // Annual Review of Biomedical Engineering. 1999. 1. P. 427.
- 15. He S., Cao H., Antovic A., Blombäck M. // Blood Coagul. Fibrinolysis. 2005. 16, N 1. P. 61.
- 16. Хачатурьян А.А., Смирнов И.В., Иванов Ю.Г. и др. // Гематол. трансфузиол. 1988. 33, № 9. С. 55.
- 17. Журов А.И. // Теор. основы хим. технол. 1995. № 2, С. 213.

БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

Experimental research of fibrin clot permeability in the presence of albumin

A. V. Nikolaev 1a , E. I. Sinauridze 2 , V. N. Buravtsev 1

¹N.N. Semenov Institute of Chemical Physics of the Ruaasian Academy of Sciences. Kosygina st. 4., Moscow 19991, Russia.

² National Research Center for Hematology of Russian Academy of Medical Sciences. Novozykovskii pr. 4a, Moscow 125167, Russia

E-mail: ^a gentoorion@mail.ru.

Fibrin clots have very small permeability, which is important for spatial aspects of blood clotting. There are non-covalent interactions between blood plasma proteins. The hypothesis of albumin precipitation on fibrin clots is checked in this work. It is shown that the albumin is not tied to fibrin clots in any significant amounts. Thus, the albumin presence does not affect the clot permeability neither during formation of the clots, nor afterwards. While permeation experiments on a free border of fibrin clots one can observe formation of a compressed zone with properties resembling compacted clots.

Keywords: fibrin, albumin, non-covalent interactions, permeability. PACS: 87.00.00, 87.15.-v, 87.15.Rn. *Received 29 October 2008.*

English version: Moscow University Physics Bulletin 3(2009).

Сведения об авторах

1. Николаев Андрей Владимирович — научн. сотр.; e-mail: gentoorion@mail.ru.

- 2. Синауридзе Елена Ивановна канд. хим. наук, ст. научн. сотр.; тел.: 612-88-70, e-mail: sinaurid@list.ru.
- 3. Буравцев Владимир Николаевич д. ф.-м. н., вед. научн. сотр.; тел.: 939-71-15, e-mail: vbur@mail.ru.