

## БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

**Инновационный подход исследования полимеризации открывает новые свойства системы свертывания**О. Э. Авилов<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.<sup>2</sup>Гематологический научный центр Российской академии медицинских наук. Россия, 125167, Москва, Новый Зыковский пр., д. 4а.E-mail: <sup>a</sup>avilovoe@mail.ru

Статья поступила 12.11.2009, подписана в печать 28.04.2010

Описана экспериментальная система оптической регистрации пространственной динамики полимеризации белков свертывания и роста фибринового сгустка в текущей плазме. Показано, что экспериментальный метод имеет диагностическую медицинскую силу, открыты новые свойства системы плазменного свертывания крови человека.

*Ключевые слова:* поток, свертывание, приборостроение, диагностика.

УДК: 577.359. PACS: 87.18.Nq.

**Введение**

Исследование свертываемости крови человека имеет важное прикладное значение. Повреждение кровеносных сосудов приводит к контакту субэндотелиальных структур (коллагеновых волокон, фибробластов, гладкомышечных клеток) с кровью и формированию сгустка, закрывающего место повреждения и предотвращающего потерю крови. Образование тромба является сложным пространственно-временным процессом. Оно начинается на поверхности поврежденного сосуда, продолжается в глубь сосуда и происходит в условиях потока крови. Важными вопросами последних лет стали вопросы исследования биохимических реакций, ответственных за начало образования тромба, увеличение его размеров, а также физических процессов (процессов диффузии и тока крови), влияющих на динамику роста тромба, а также проблемы, связанные с диагностикой патологий системы свертывания. В настоящее время уже существуют экспериментальные модели, позволяющие регистрировать образование тромбов как *in vivo*, так и *in vitro*. *In vivo* исследования проводились в режиме реального времени в сосудах мышей, с запуском свертывания за счет повреждения стенки сосуда с помощью сфокусированного лазерного пучка [1], механического повреждения микроинструментами [2] или повреждения электрическим током [3]. Растущий тромб регистрировался либо по флуоресценции антител к компонентам тромба (например, антитела к фибрину (основной строительный компонент сгустка) или тканевому фактору (белок, запускающий свертывание)) [5], либо по светорассеянию в сосудах, находящихся близко к поверхности кожи [1]. Такого рода системы позволяют регистрировать начальные стадии и динамику увеличения размеров тромба, изучать его состав и геометрию. Вторым экспериментальным направлением являются системы, имитирующие динамику тромбообразования *in vitro* [4]. Использование искусственных систем имеет преимущество, так как

позволяет контролировать и варьировать не только состав плазмы и концентрации отдельных типов клеток крови, но и другие условия эксперимента, направленно выявляя роль отдельных участников в процессе тромбообразования. Однако все эти системы производят регистрацию растущего тромба либо из вида сверху, либо снизу на просвет, что не позволяет корректно судить о размере (т.е. о толщине) сгустка. Следовательно, первым практическим этапом стало создание искусственной системы, которая была бы лишена описанных выше недостатков при сохранении всех достоинств метода *in vitro*.

**1. Экспериментальная система**

В настоящей работе описывается экспериментальная система, предназначенная для исследования процессов полимеризации в потоке, влияния потока плазмы на образование фибринового сгустка. На рис. 1 приведена принципиальная схема построенной экспериментальной системы. Она состоит из исследовательской проточной камеры (1, 3, 4, 5, 7–10), которая помещается в воду, находящуюся в термостатируемой кювете при заданной температуре (в нашем случае 37°С) с прозрачным дном, и освещается снизу монохромными диодами 12 с длиной волны излучения  $\lambda = 635$  нм. Канал тока жидкости внутри проточной камеры формируется между прокладками из черного пластика 8, прокладки из силиконовой резины 5 с вырезанным в ней каналом заданных геометрических размеров и прокладки из прозрачного пластика 9. Герметизация камеры осуществляется за счет равномерного прижима крышки проточной камеры 1 к ее основной части. Подача плазмы производится от исследуемых образцов 16 по трубкам 2, 6. В крышке 1 проделаны входное 3 и выходное 7 отверстия для подачи рекальцифицированной и отбора отработанной плазмы, которая предварительно термостатируется при 37°С в рубашке 17 перед попаданием в проточную камеру. Подача исследуемых

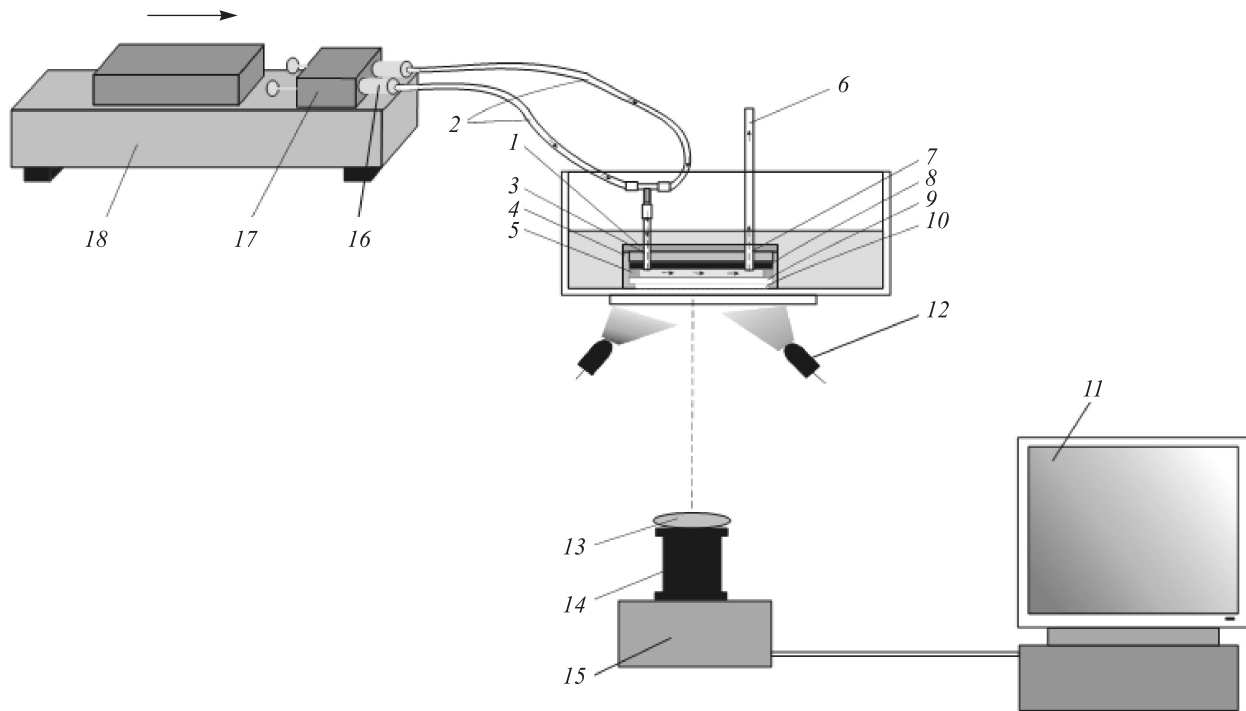


Рис. 1. Принципиальная схема экспериментальной системы: система подачи образцов (2, 16–18); термостатируемая проточная камера (1, 3–10), где происходит формирование сгустка; система регистрации, хранения и обработки информации (11–15). Термостатирование осуществляется при температуре +37°С, источником освещения являются монохромные диоды красного света

образцов производится при помощи насоса 18 толкающего или перистальтического типа. Изображение области контакта плазмы с активатором фокусируется с помощью системы, состоящей из телеобъектива 14 и короткофокусного конденсора 13 и цифровой камеры на охлаждаемой ПЗС-матрице 15. Для проведения эксперимента и сбора данных используется написанная на основе драйвера видеокамеры компьютерная программа, которая записывает изображение растущего сгустка с некоторым интервалом времени на жесткий диск. Для снижения темновых шумов проводится накопление кадров. Оцифрованное ПЗС-камерой изображение передается в компьютер 11. Полученная при регистрации видеорама растущего сгустка анализируется с помощью специально написанной программы для обработки изображений. Результатом анализа являются профили интенсивности регистрируемого сигнала в направлении, перпендикулярном активатору, что позволяет судить о динамике роста сгустка. Для уменьшения шумов значения светорассеяния усредняются внутри полосы перпендикулярно росту сгустка. На рис. 2 показаны изображения, получаемые новой системой, а также три полосы, вдоль которых исследовалась динамика роста сгустка. По сериям профилей светорассеяния определялись количественные показатели формирования сгустка: интенсивность светорассеяния, время задержки, скорость роста.

## 2. Материалы и методы

Для проведения экспериментов плазмаготавливалась стандартным образом из крови, взятой на антикоагулянте (3.8% раствор цитрата Na, pH 5.5) [7]. Перед началом эксперимента плазма рекальцифициро-

валась, т.е. концентрация ионов кальция в ней доводилась до физиологических значений с помощью раствора CaCl<sub>2</sub>, приготовленного на основе буфера 20 мМ HEPES, 140 мМ NaCl, pH 7.4. Для уменьшения эффекта преактивации плазмы вследствие ее контакта с искусственными поверхностями в препарат плазмы добавляли СТИ в конечной концентрации 0.2 мг/мл, рекальцификация плазмы проводилась «в потоке» при помощи Т-образного смесителя из полиэтилена высокого давления (Fisher Scientific). Образование сгустка инициировалось искусственно выращенным на мягкой подложке слоем клеток — фибробластами, как предложено ранее [6]. В работе использовалась культура клеток из легких человека. Фибробласты на своей поверхности покрыты белком тканевым фактором, который при контакте с плазмой крови запускает свертывание. Пленка с фибробластами крепилась с внутренней стороны канала, не изменяя при этом его геометрии. Для внутренних поверхностей был выбран полистирол как один из наиболее биологически инертных материалов [6]. Для уменьшения эффекта контактной активации полистироловые компоненты камеры являются одноразовыми. Силиконовая прокладка изготавливается из коммерчески доступного силикона (Dow Corning).

## 3. Экспериментальные результаты

Исследование роста сгустка в поточной камере при отсутствии потока показало, что полученные результаты не только качественно, но и количественно совпадают с результатами, полученным для системы без перемешивания (скорость роста сгустка составила  $47.7 \pm 7.0$  мкм/мин, через 10–20 мин после начала

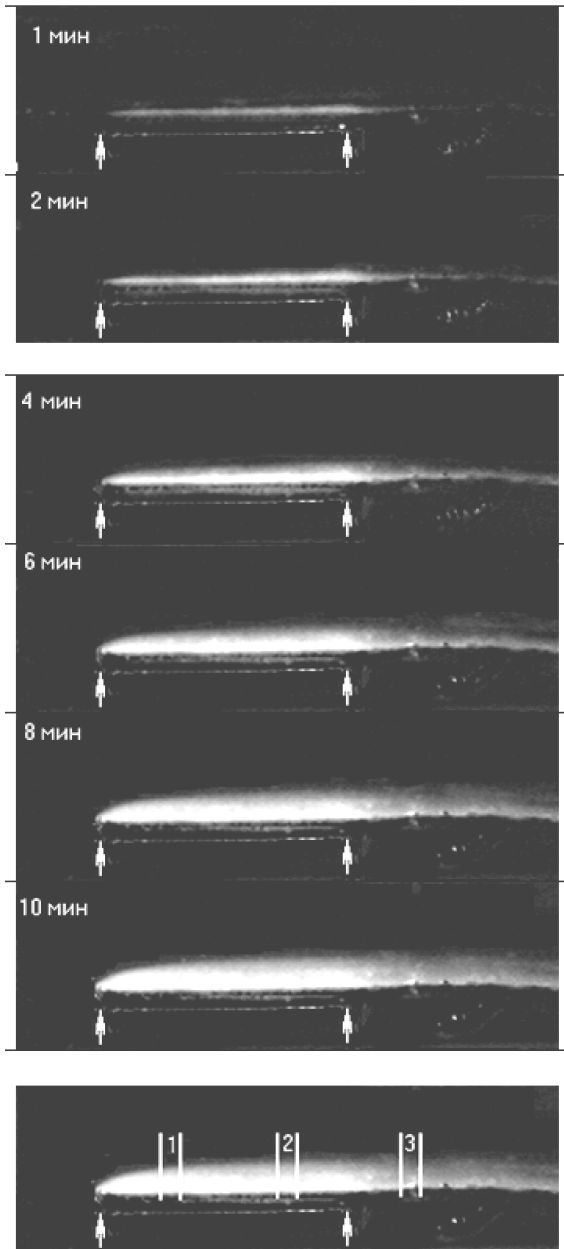


Рис. 2. Изображения сгустка, растущего в потоке. Стрелками белого цвета показаны границы монослоя фибробластов с внутренней стороны канала, моделирующие место повреждения сосуда и запускающие свертывание. Реперами 1, 2 и 3 показаны границы и направления, по которым проводилась обработка результатов экспериментов

эксперимента в разных участках камеры возникали спонтанные сгустки). На рис. 2 показаны фотографии растущего сгустка в потоке текущей плазмы (плазма течет слева направо). Зона активации роста отмечена стрелками. Нетрудно видеть, что сгусток сначала покрывает зону активации (пленку с фибробластами), затем продолжает расти в глубь канала и ниже по потоку, увеличиваясь в размерах. Особенностью сгустка является наличие вытянутого по потоку фибринового «хвоста». Было произведено около 400 экспериментов с плазмой крови нормальных доноров, у которых не было болезней крови. При проведении экспериментов варьировалась скорость потока — скорость сдвига при

этом составляла от 0 до  $3000 \text{ с}^{-1}$ , поперечные размеры канала  $1 \times 1 \text{ мм}$ , длина канала 87 мм. При обработке измерялись следующие параметры:

1) время задержки свертывания — время от начала эксперимента до начала роста сгустка, т.е. когда эксперимент уже идет, но формирования сгустка не наблюдается;

2) скорость роста сгустка в середине активатора (мкм/мин);

3) угол переднего фронта сгустка в градусах, измеренный на 40-й минуте эксперимента;

4) максимальная толщина сгустка в миллиметрах от границы канала, измеренная на 40-й минуте эксперимента. При этом также анализировалось местоположение максимальной толщины, которое измерялось в миллиметрах вниз по потоку от начала активатора.

Первые же эксперименты показали, что поток кардинальным образом влияет на формирование сгустка. Белки, или факторы свертывания, находятся в крови в достаточных для работы системы свертывания концентрациях. Однако для предотвращения ложного срабатывания системы свертывания и патогенного образования тромбов в произвольных местах факторы свертывания находятся в крови в неактивном состоянии. В процессе работы каскада свертывания и полимеризации фибрина факторы переводятся из неактивного в активное состояние. Активные факторы свертывания сносятся ниже по потоку, что сказывается на форме сгустка — он вытягивается вдоль канала ниже по потоку — у сгустка образуется своеобразный «хвост». Роста же против потока практически не наблюдается, передний край за счет сопротивления потоку уплотняется, а максимальные скорости роста для любого эксперимента наблюдаются перпендикулярно активатору внутрь канала. Ранее не наблюдавшаяся особенность растущего в потоке сгустка состоит в том, что интенсивность светорассеяния оказывается выше вблизи монослоя с фибробластами (около 200 отн. ед.) по сравнению с его хвостовой частью (около 130–150 отн. ед.), что позволяет говорить о пространственно-неоднородной структуре фибринового сгустка.

На рис. 3, а показана зависимость времени задержки от скорости сдвига: видно, что поток сильно ингибирует процессы полимеризации, что приводит к нелинейному ответу системы свертывания. Данные результаты получены для свободной от тромбоцитов плазмы. Весь массив экспериментальных данных можно условно разделить на два участка. На первом из них (от 0 до  $700 \text{ мин}^{-1}$ ) роста времени задержки свертывания в пределах погрешности измерений не происходит (все значения укладываются в диапазон 0–12 мин). На втором участке, таком же по диапазону скоростей (от  $700$  до  $1400 \text{ мин}^{-1}$ ), система свертывания постепенно перестает сопротивляться потоку, что приводит к нелинейному росту времени задержки свертывания в 7 раз. Следует отметить, что данное нелинейное поведение системы свертывания описано впервые. При скоростях потока более  $500\text{--}700 \text{ мин}^{-1}$  время задержки представляет собой временно промежуток между началом эксперимента и инициацией свертывания. При временах задержки более 60 мин по физиологическим соображениям считаем, что свертывание в данном слу-

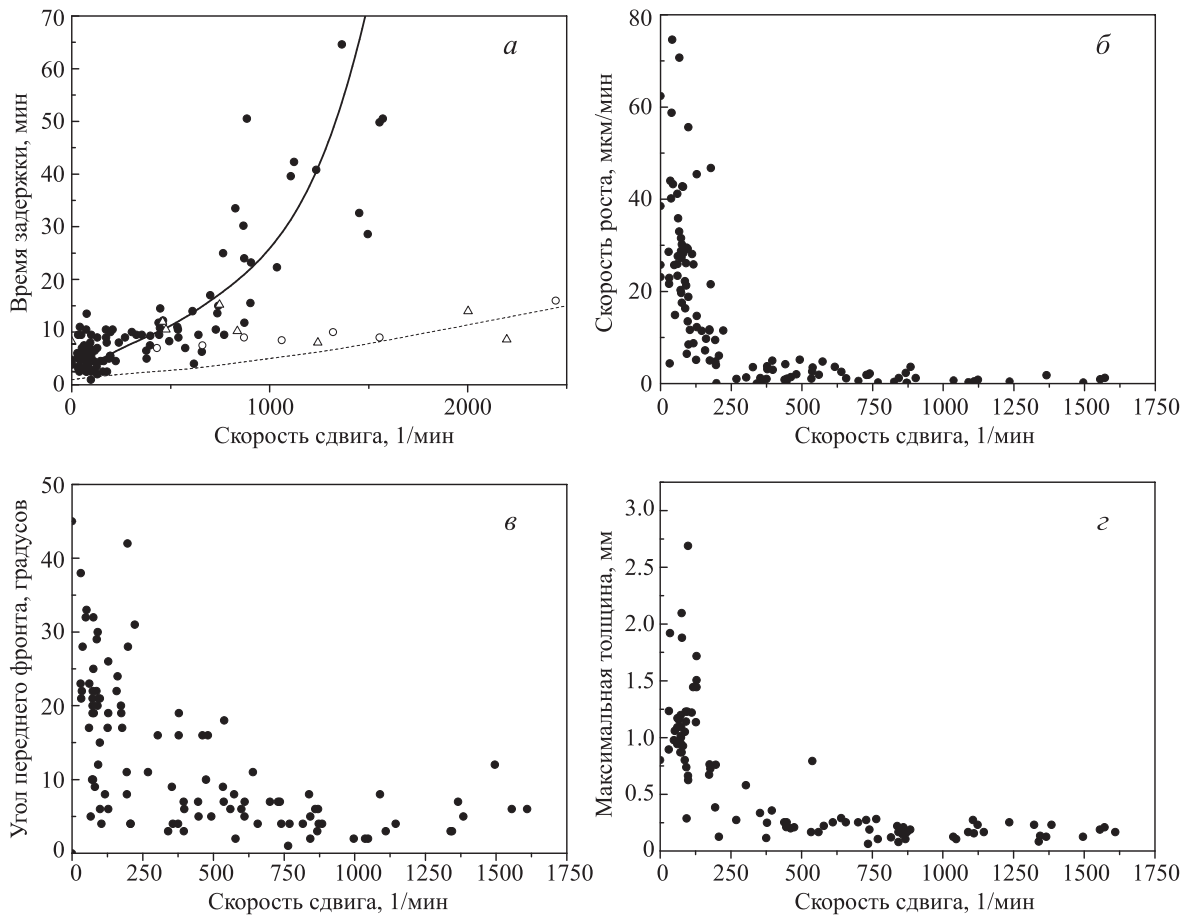


Рис. 3. Зависимости от скорости потока (результаты теоретических модельных расчетов показаны сплошными линиями): времени задержки (а); скорости роста по реперу 2 (б); углов переднего фронта сгустка на 40-й минуте эксперимента (в) и максимальной толщины сгустка на 40-й минуте эксперимента (г)

чае не начинается совсем (так как более 1 ч после начала эксперимента не начиналось формирование сгустка). Нетрудно видеть, что полученные экспериментальные данные хорошо согласуются с теоретическими расчетами, выполненными А. М. Шибeko в ГНЦ РАМН [8]. Увеличение скорости потока также оказывает существенное влияние и на скорость роста сгустка в середине активатора перпендикулярно стенке канала в глубь сосуда. На рис. 3, б приведена зависимость скорости роста от скорости сдвига. Согласно полученным данным, давление потока оказывает ингибирующее влияние на каскадный процесс полимеризации и приводит к резкому (более чем на порядок) падению скорости роста сгустка. Это позволяет говорить о влиянии гидродинамического фактора (а именно скорости потока) на скорость работы каскада биохимических реакций, что для системы свертывания также является новым свойством, описанным впервые. Следует отметить, что при этом резко падает только скорость роста вглубь канала, а активатор, имитирующий место повреждения, по-прежнему целиком закрывается сгустком при начале роста. На рис. 3, в, г приведены зависимости угла переднего фронта сгустка и максимальной его толщины от скорости сдвига. Гиперболический характер снижения параметров говорит о том, что при увеличении скорости потока нелинейно увеличивается количество сносимых ниже по потоку от активатора активных

факторов свертывания, что приводит к снижению скорости работы всего каскада свертывания, т. е. сгусток становится тоньше, более плоским, в результате чего уменьшается угол его переднего фронта.

Таким образом, начиная со скоростей сдвига более  $1500 \text{ мин}^{-1}$  время задержки теряет свой физиологический смысл, скорость роста тромба резко падает и можно говорить об эффекте «выключения» свертывания потоком. Однако на практике у здоровых людей не наблюдается таких явных задержек при локализации кровопотери, и возникает вопрос о возможном механизме, поддерживающем работоспособность системы свертывания. Была проведена серия экспериментов с богатой тромбоцитами плазмой здоровых доноров. Оказалось, что поверхность тромбоцитов является сильным катализатором активации группы факторов свертывания, что приводит к резкому усилению тромбогенной активности, и нелинейного ответа в данном случае мы уже не видим (рис. 3, а). Предположительный механизм такого поведения системы заключается в том, что фосфолипидная поверхность тромбоцитов является катализатором при активации белков каскада системы свертывания, что приводит к ускорению процессов полимеризации и уменьшению времени задержки свертывания на скоростях более  $700 \text{ мин}^{-1}$ . Подобный эффект был обнаружен при использовании замороженной плазмы. После получения свободной от тромбоцитов плазмы

перед проведением эксперимента ее предварительно замораживали до температуры  $-80^{\circ}\text{C}$ . Непосредственно перед экспериментом она проходила процедуру мягкой разморозки при  $+37^{\circ}\text{C}$ . Оказалось, что как качественно, так и количественно поведение системы свертывания богатой тромбоцитами, но не замороженной и свободной от тромбоцитов, но замороженной плазмы в пределах погрешности измерения одинаковы. Данный факт также ранее не описан в литературе и может говорить о положительном эффекте трансфузионных процедур для людей, страдающих гемофилией, их же собственной плазмой, прошедшей процедуру заморозки/разморозки для стабилизации тромбообразования и предотвращения внутренних кровотечений.

Конечной стадией формирования фибринового сгустка является полимеризованная сеть фибриновых волокон, которые эффективно препятствуют проникновению через повреждение не только клеток крови, но и плазмы. При скоростях сдвига более  $700 \text{ мин}^{-1}$  был обнаружен еще один новый для плазменного звена системы свертывания эффект, типичное поведение которого приведено на рис. 4. Исследование проводилось в приактиваторной области канала. На графике можно выделить три стадии: 1) отсутствие сигнала и как результат отсутствие роста сгустка; 2) резкий подъем уровня сигнала светорассеяния — формирование тромба в исследуемой области; 3) плавный рост — плавное увеличение сигнала светорассеяния внутри сети полимеризовавшихся волокон фибрина. Поскольку сгусток является препятствием от кровопотери, то неожиданным является тот факт, что приносимые с потоком факторы свертывания за счет диффузии попадают внутрь сгустка и продолжают процесс полимеризации, что в свою очередь приводит к монотонному росту сигнала. Данный факт является новым и несомненно заслуживает дальнейшего изучения.

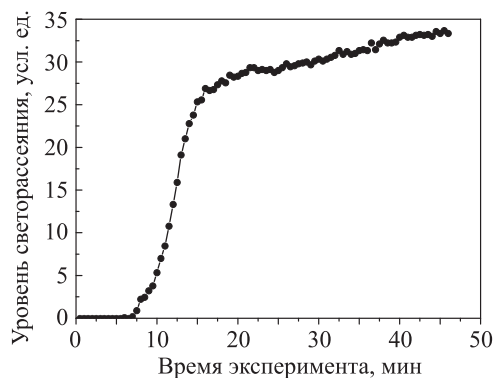


Рис. 4. Типичное поведение кинетики светорассеяния для эффекта на высоких скоростях: первый этап — начало эксперимента (сигнал близок к нулевому, роста сгустка нет); второй — формирование сгустка (быстрое нарастание регистрируемого сигнала); третий — уплотнение сгустка (медленный плавный рост сигнала)

Проведенная серия экспериментов с плазмой людей, страдающих отклонениями в системе свертывания (гемофилия и диссеминированное внутрисосудистое свертывание), показала, что при данной экспериментальной методике, измеряя описанные выше параметры (время задержки, скорость роста, уровень сигнала светорассеяния), можно выявить их отличия от параметров от плазмы здоровых доноров, что позволяет говорить о применении данной системы не только в исследовательских целях, но и в медицинской диагностике.

## Заключение

Построенный экспериментальный комплекс позволяет получать последовательные во времени изображения растущего сгустка, обрабатывая полученные изображения получать информацию о динамике роста тромба, обладает следующими основными техническими характеристиками: диапазон поточных скоростей в камере  $10\text{--}2000 \text{ мкл/мин}$  ( $0\text{--}3000 \text{ мин}^{-1}$ ), временное разрешение начала эксперимента (от момента рекальцификации) до 30 с, временное разрешение в ходе процесса 30 с, ошибка измерений не более 4%. Таким образом, построенная система открывает новые возможности по исследованию тромбообразования в потоке, позволяя получать не только фундаментальные сведения о формировании сгустка в потоке, но и в перспективе использовать его в прикладном направлении. Кроме того, данная система положительно зарекомендовала себя как диагностический инструмент при определении патологий системы свертывания на ранних стадиях, не определяемых стандартными тестами, и может служить прототипом для клинической системы диагностики.

Автор выражает благодарность профессорам Ф. И. Атаулаханову и В. А. Твердислову за неоценимую помощь в выполнении настоящего исследования.

## Список литературы

1. Falati Sh., Gross P., Merrill-Skoloff G. et al. // Nature medicine. 2002. **8**, N 10, P. 1175.
2. Goto Sh. // Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. 2004. P. 2207.
3. Stokmans F., Stassen J.M., Vermynen J. // Ann. Plastic Surgery. 1997. **38**, N 1. P. 56.
4. Grabowski E.F. // Amer. Soc. Hematol. 1990.
5. Balasubramanian V., Grabowski E., Bini A., Nemerson Y. // Amer. Soc. Hematol. 2002.
6. Биосовместимость / Под ред. В. И. Севастьянова. М., 1999.
7. Ovanesov M.V., Krasotkina Yu.V., Ul'yanova L.I. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2002. P. 25349.
8. Panteleev M.A., Ovanesov M.V., Kireev D.A. et al. // Biophys. J. 2006. **90**. P. 1489.

**Innovation experimental methods opens up new properties of polymerization in coagulation****О. Е. Авилов**<sup>1,2</sup><sup>1</sup>*Department of Biophysics, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.*<sup>2</sup>*Research Center of Hematology, Noviy Zikovskiy proezd 4a, Moscow 125167, Russia.**E-mail: avilovoe@mail.ru.*

Current article describes experimental system of optical registration of polymerization dynamics of blood coagulation proteins. It was shown that experimental method has diagnostic abilities while defining some coagulation pathologies, this method has, some new properties of coagulation system were discovered. Experimental system described is a prototype for clinical diagnostic system.

*Keywords:* blood flow, coagulation, instrument-making, diagnostics.

PACS: 87.18.Nq.

*Received 12 November 2009.*

English version: *Moscow University Physics Bulletin* 5(2010).

**Сведения об авторе**

1. Авилов Олег Эрнестович — аспирант; тел.: (495) 939-30-25; e-mail: avilovoe@mail.ru.