

Жалялов Ансар Сайярович

Исследование пространственной динамики роста и лизиса  
фибринового сгустка в условиях тромболитической терапии

03.01.02 - биофизика

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва

2019

Работа выполнена в Учреждении Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН.

Научный руководитель: кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и биофизики клетки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, **Шибeko Алексей Михайлович**

Официальные оппоненты: Доктор медицинских наук, профессор  
**Литвинов Рустем Игоревич**

Профессор кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии; главный научный сотрудник, НИЛ “Белково-клеточные взаимодействия” Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования Казанский федеральный университет

Доктор биологических наук  
**Холмухамедов Эхсон Лукманович**

Главный научный сотрудник лаборатории тканевой инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

Защита состоится " " \_\_\_\_\_ 2019 г. в \_\_\_\_\_ час.  
на заседании диссертационного совета Д002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального Государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, 38 и на сайте <https://ibcp.chph.ras.ru/diss-socket/razmeshchennye-dissertatsii/290-dissertatsiya-zhalyalova-ansara-sajyarovicha>

Автореферат разослан " " \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д002.039.01  
кандидат химических наук

Мазалецкая Лидия Ивановна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Свертывание крови и фибринолиз являются взаимосвязанными системами, регулирующими образование и разрушение фибриновых сгустков в организме человека. Обе системы представлены каскадами реакций, с положительными и отрицательными петлями обратной связи. Система свертывания запускается контактом крови с тканевым фактором (TF), трансмембранным гликопротеином, присутствующим в области повреждения сосуда. Связывание тканевого фактора с циркулирующим в плазме фактором VIIa приводит к образованию комплекса, активирующего фактор X, что в конечном итоге приводит к образованию тромбина. Тромбин в свою очередь превращает белок фибриноген в фибрин, который полимеризуется и образует фибриновый сгусток, препятствующий кровопотере.

После того, как потребность в сгустке исчезает, в работу включается другая ферментативная система, отвечающая за разрушение сгустка – система фибринолиза. Каскад реакций фибринолиза может быть инициирован либо тканевым активатором плазминогена (TPA), секретлируемым сосудистой стенкой, либо урокиназным активатором плазминогена (UPA) (Collen 1980). Важнейшим триггером и кофактором для работы системы фибринолиза является сам фибрин, который не только защищает плазмин от инактивации (Wiman et al. 1978), но и на порядок ускоряет действие TPA (Liu und Gurewich 1991).

Тромболитическая терапия (ТЛТ) является медикаментозным способом устранения окклюзии кровеносных сосудов, заключающаяся в введении в кровотоки препаратов, активирующих систему фибринолиза. В общем случае, причина образования тромбов может не исчезнуть, и тогда, в период ТЛТ, могут образовываться новые тромбы, поэтому исследование процессов свертывания и лизиса в плазме в период ТЛТ является важной практической задачей.

Следует учитывать, что функционирование систем коагуляции и фибринолиза происходит в пространственно неоднородной среде: ферменты, образованные в одном месте, транспортируются диффузией и течением крови в другое (Panteleev et al. 2015). Более того, сами процессы свертывания и лизиса пространственно неоднородны: сгустки должны формироваться и растворяться строго в месте повреждения (Vucay et al. 2015). И это, вероятно, является решающим фактором в их регуляции: известно множество примеров того, что роли отдельных реакций изменяются в пространстве и времени (Dashkevich et al. 2012) или в присутствии потока (Shibeko et al. 2010). Исследования, проводившиеся на протяжении последних десятилетий, привели к значительному прогрессу представлений о роли пространственной компоненты в процессе

свертывании крови (Panteleev et al. 2010), в то время как для фибринолиза данный вопрос остается открытым.

Целью настоящей работы являлось изучение процессов свертывания и лизиса в системе, моделирующей образование сгустка в период тромболитической терапии, учитывая пространственный аспект фибринолиза.

Была разработана пространственно-диффузионная экспериментальная модель, в которой свертывание запускалось иммобилизованным на поверхности тканевым фактором, а лизис запускался с помощью добавления в плазму активаторов плазминогена. С помощью системы видеомикроскопии проводилось наблюдение за ростом и лизисом сгустка *in vitro*.

**Цель работы:** Изучить пространственную динамику роста и лизиса фибринового сгустка в условиях, моделирующих тромболитическую терапию.

**Задачи исследования:**

1. Разработать экспериментальную методику исследования пространственной динамики роста и лизиса фибринового сгустка в условиях, моделирующих рост сгустка в период ТЛТ, на базе системы для исследования пространственного роста сгустка “Тромбодинамика” (ООО Гемакор).
2. Установить зависимость типов и параметров пространственного лизиса сгустка от концентрации тканевого активатора плазминогена.
3. Определить влияние скорости распространения волны свертывания на скорость распространения волны лизиса.
4. Исследовать влияние высоких концентраций тромболитических препаратов на пространственную динамику свертывания и лизиса.

**Научная новизна.** В рамках данной работы была построена экспериментальная реакционно-диффузионная система для оценки параметров роста и лизиса фибринового сгустка, моделирующая процессы в период ТЛТ, позволяющая наблюдать рост и лизис сгустка в реальном времени. Было обнаружено три основных типа волны лизиса – фронт лизиса, распространяющийся изнутри сгустка, фронт лизиса, распространяющийся от активирующей свертывание поверхности и, его частный случай, лизис, останавливающийся через некоторое время. Тип волны лизиса сгустка зависит от концентрации фибринолитического агента в плазме и не зависит от типа активатора плазминогена (ТРА, УРА, SK). При терапевтических концентрациях ТРА волна лизиса начинается от поверхности на которой растет сгусток. При высоких концентрациях активаторов плазминогена экспериментально наблюдается явление замедления лизиса, вплоть до его остановки. С помощью компьютерного моделирования показано, что данное явление вызвано истощением свободного плазминогена. Скорость распространения фронта волны

лизиса линейно зависит от скорости распространения фронта свертывания ( $r^2 = 0,91$ ). Экспериментально установлено, что при высоких концентрациях тромболитических препаратов в плазме происходит активация свертывания в результате реакции активации фактора IX плазмином.

**Научно-практическое значение.** Разработанная *in vitro* методика оценки показателей пространственной динамики фибринолиза может быть использована в клинической практике для корректировки ТЛТ. Обнаруженное явление распространения волны лизиса, отделяющей образующийся сгусток от области крепления, может послужить базой для разработки новых методов устранения сгустков. Полученные результаты, свидетельствующие о снижении фибринолитической активности при высоких концентрациях ТРА, могут быть использованы при подборе дозировок препаратов. Открытый эффект активации фактора IX плазмином важно учитывать при разработке новых протоколов ТЛТ, лекарственных средств и стратегий их использования.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Разработана *in vitro* методика исследования пространственной динамики роста и лизиса фибринового сгустка в условиях, моделирующих рост сгустка в период ТЛТ. При терапевтических концентрациях ТРА, волна лизиса появляется на поверхности, активирующей свертывание, отделяя образующийся сгусток от поверхности, создавая риск отрыва сгустка.

2. Обнаружено три типа волны лизиса в зависимости от концентрации ТРА. При увеличении концентрации ТРА до сотен нМ, время задержки лизиса уменьшается, скорость лизиса увеличивается, выходя на плато. При дальнейшем увеличении концентрации ТРА фибринолитическая активность снижается.

3. Определено, что скорость волны лизиса в диапазоне терапевтических концентраций ТРА линейно зависит от скорости распространения волны свертывания.

4. Установлено, что при высоких концентрациях тромболитических препаратов в плазме происходит активация свертывания в результате активации фактора IX плазмином. С помощью компьютерного моделирования показано, что снижение фибринолитической активности при высоких концентрациях ТРА связано со снижением концентрации плазминогена.

**Апробация работы.** Материалы диссертации докладывались на международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам "Ломоносов-2012" (Москва, апрель 2012), на IV съезде биофизиков России (Нижний Новгород, август 2012), на XXIV International Society on Thrombosis and Haemostasis Congress, (Amsterdam, Голландия, июль 2013), на 38th Federation of the European Biochemical Societies Congress (Санкт-Петербург, август 2013).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и тезисы 5 докладов в сборниках трудов международных и российских конференций.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 117 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, списка цитируемой литературы, трех приложений и библиографического указателя, включающего 185 источников.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Обзор литературы

Глава посвящена анализу существующих данных о системах свертывания и фибринолиза, об их взаимосвязи и регуляции. Приведены данные об основных компонентах системы фибринолиза. Отдельный раздел посвящен обзору существующих методов исследования фибринолиза, рассмотрены области их применения, преимущества и недостатки.

### Глава 2. Материалы и методы

#### 2.1. Материалы

*Стрептокиназа.* Очищенный белок Streptokinase from hemolytic Streptococcus (PN S3134), активность >4200МЕ/мг, Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США).

*Урокиназа.* Высокомолекулярная урокиназа, HMW-uPA, American Diagnostica (Стенфорд, США), M=52 кДа. Белок находился в буфере 50 мМ TRIS-HCl, 100 мМ NaCl, 0.1% PEG, 200 мМ Mannitol, pH 7.4.

*Тканевый активатор плазминогена.* В экспериментах использовался медицинский препарат “Актилизе” от Boehringer Ingelheim (Германия). 1 флакон содержит альтеплаза 50 мг (1 мл готового р-ра - альтеплаза 1 мг); вспомогательные вещества: L-аргинин (1.742 г/фл.), фосфорная кислота (536 мг/фл.), полисорбат 80 (менее 5 мг/флакон, менее 100 мкг/1 мл готового раствора).

*Набор “Тромбодинамика”:* HEPES, кукурузный ингибитор трипсина (КТИ), Ca(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, поверхность с иммобилизованным тканевым фактором от компании Гемакор (Москва, Россия). Человеческий рекомбинантный тканевый фактор (рекомбиластин 2G, Instrumentation Laboratory Company, Бедфорд, США) был иммобилизован на поверхность компанией Гемакор, методом, описанным в статье (О.А. Fadeeva et.al 2010).

*Гепарин:* Нефракционированный гепарин, производитель Ферейн (Москва, Россия).

*Активированный фактор XI:* Haematologic Technologies (Вермонт, США).

*Фосфолипиды:* Phospholipid-TGT, Rossix (Швеция).

*Подготовка плазмы:* Плазма была получена из цельной крови здоровых добровольцев, национальным медицинским исследовательским центром детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева (Москва, Россия). Кровь бралась в 4.5 мл пробирки (Greetmed, China) с 3.8% цитратом натрия в объемном соотношении кровь:антикоагулянт = 9:1. Кровь центрифугировалась при 100g в течение 5 минут для отделения эритроцитов от плазмы (богатая тромбоцитами плазма, PRP). После отделения от эритроцитов PRP плазма центрифугировалась на ускорении 10 000g в течение 5 минут для удаления тромбоцитов (свободная от тромбоцитов плазма, PFP). PRP разбавлялась PFP плазмой для получения итоговой концентрации тромбоцитов 300 тыс. кл./мкл.

PRP и PFP были собраны в пул из 5 доноров и заморожены при -80°C.

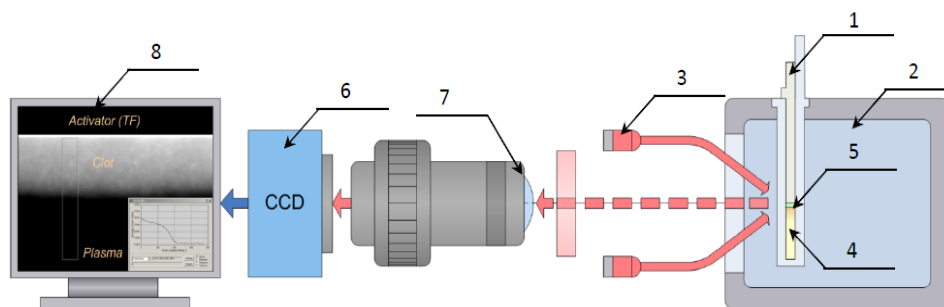
*Клеточная культура:* Клеточная линия фибробластов легких эмбриона человека была предоставлена НИИ вирусологии имени Д. И. Ивановского (Москва, Россия). Пленки полиэтилентерефталата с монослоем фибробластов были получены по методу, описанному ранее (Balandina et al. 2011). Средняя плотность тканевого фактора на пленках измерялась с использованием набора Actichrome-TF (Sekisui Diagnostics, США), и она составляла  $140 \pm 15$  пмоль/м<sup>2</sup>.

## **2.2. Пациент (данные М.Грачевой)**

Мальчик, 1,5 года, с миеломоноцитарным лейкозом, осложненным катетер-ассоциированным тромбозом левой подвздошной вены. Пациент получал терапию ТРА 0,03 мг/кг/ч с гепарином 10 МЕ/кг/ч.

## **2.3. Методы**

*Видеомикроскопия:* Эксперименты по росту и лизису сгустка проводились с использованием системы видеомикроскопии, схема которой представлена на рисунке 1. Обработка изображений производилась с помощью приложения “Тромбодинамика” (ООО “Гемакор”) с дополнениями в части расчета скорости волны фибринолиза. Плазма размораживалась при 37°C в течение 30 минут на водяной бане, после чего в плазму добавлялись реагенты (HEPES, КТИ, активаторы плазминогена) и проводилась рекальцификация плазмы путем добавления Ca(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>. Полученный образец заливался в кювету, в которую вставлялась пластинка с иммобилизованным тканевым фактором, запускавшим свертывание. При образовании сгустка плазма переходит из жидкого в гелеобразное состояние, вследствие чего изменяется интенсивность светорассеяния. Сигнал светорассеяния попадает на матрицу видеокамеры, оцифровывается и передается на компьютер для обработки.

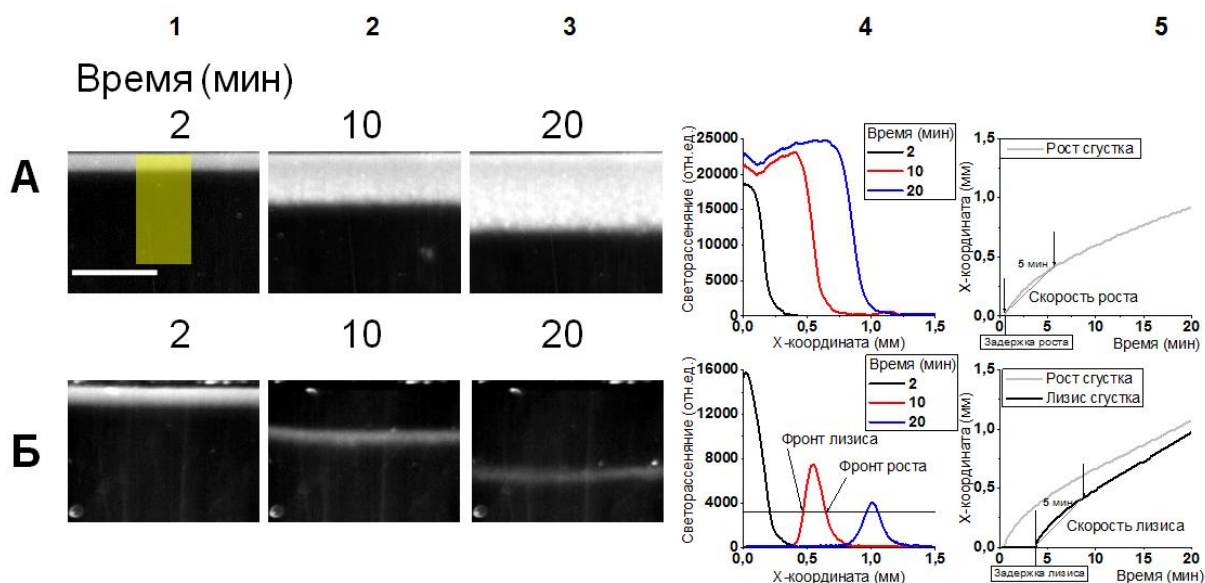


**Рисунок 1.** Схема установки: Система состоит из кюветы (1), которая помещается в воду, находящуюся в прозрачном термостатируемом контейнере при 37°C (2), и освещается сбоку светодиодами длиной волны 625нм (3). Изображение исследуемой области контакта плазмы (4) с активатором (5) фокусируется на матрице видеокамеры (6) при помощи фотообъектива (7). Оцифрованное изображение передается на компьютер (8).

*Обработка данных:* в результате эксперимента был получен набор фотографий фибринового сгустка (рисунок 2). Интенсивность рассеянного сигнала прямо пропорциональна концентрации фибрина, вследствие чего мы могли рассматривать интенсивность сигнала как относительную концентрацию фибрина. Поскольку светорассеяние зависит также от толщины фибринового волокна, которая, в свою очередь зависит от концентрации тромбина, мы можем предположить, что в нашей экспериментальной системе структура сгустка фибрина является однородной, т.к. распространяющаяся автоволна тромбина имеет постоянную пиковую концентрацию 50 нМ, вследствие чего сигнал светорассеяния зависит, в основном, только от концентрации фибрина. Сигнал светорассеяния в исследуемой области усреднялся в горизонтальном направлении (60-80 пикселей в ширину) (рисунок 2 А1, желтый прямоугольник), что позволяло перейти к одномерной зависимости сигнала от вертикальной координаты для каждого момента времени (рисунок 2 А4 и Б4). Был введен пороговый уровень сигнала, выше которого считали сгусток в заданной области сформированным. Как только в какой-либо области данный порог был превышен, мы считали, что там появился сгусток, и когда уровень сигнала уменьшался ниже этого порога, мы считали, что сгусток растворился. Были определены координаты этих двух событий для каждого момента и построены их зависимости от времени (рисунок 2 А5 и Б5) для оценки времени задержки свертывания (лизиса), и скорости роста и лизиса сгустка. Время задержки свертывания (лизиса) определяли, как время, прошедшее с момента активации коагуляции до момента, когда фронт роста (лизиса) сгустка начал двигаться. На рисунке 2 показано, что скорость распространения фронта роста (лизиса) сгустка со временем уменьшается. Для оценки скорости использовалось линейное приближение скорости для первых пяти минут с момента начала роста (лизиса) сгустка. Были проведены сравнения различных пороговых уровней сигнала и получены согласующиеся результаты. В



качестве порогового был выбран уровень сигнала, составляющий 20% от максимального, который и был использован при обработке полученных данных.

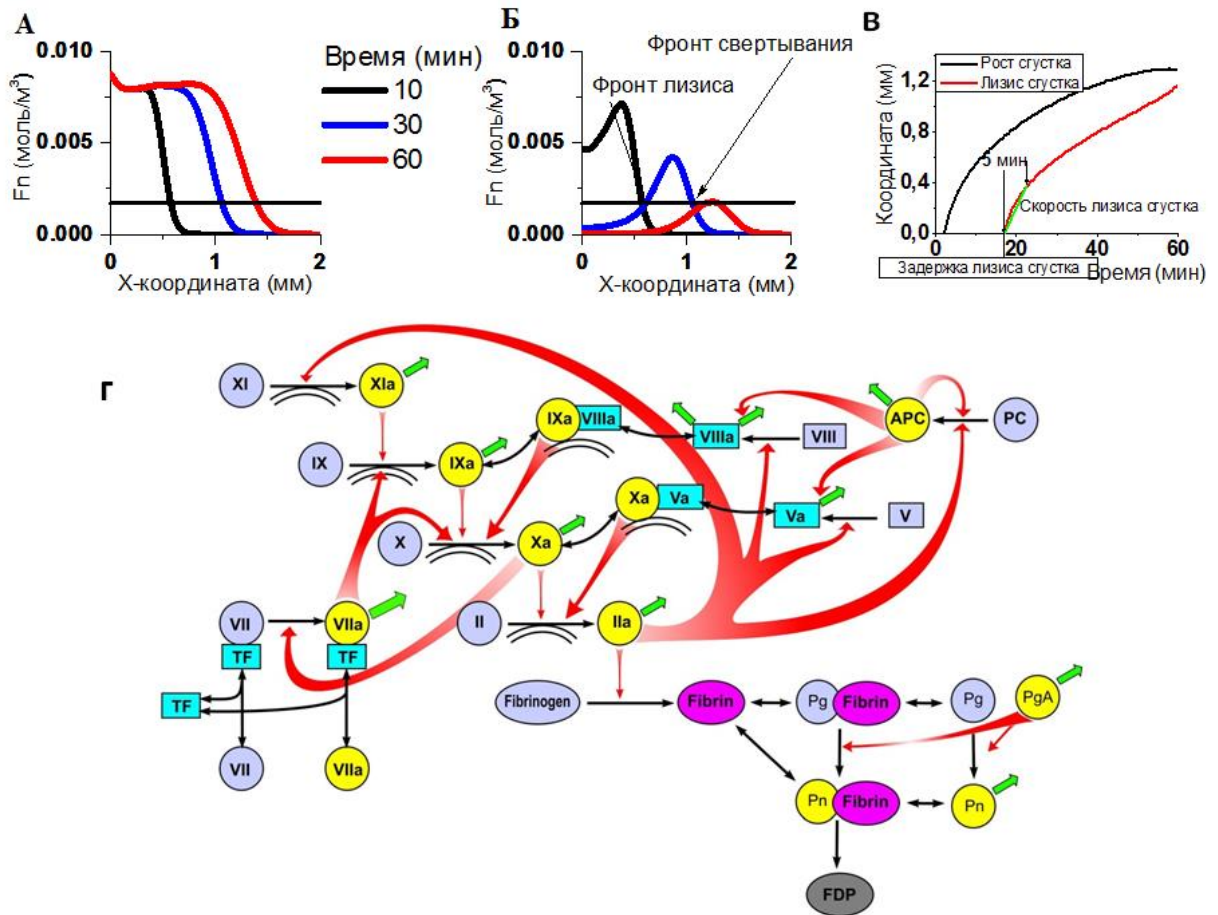


**Рисунок 2.** (А) Фотографии роста фибринового сгустка в отсутствие активаторов плазминогена через различное время после запуска свертывания: А1 – 2, А2 – 10 и А3 – 20 минут. (Б) Аналогичные фотографии в случае добавления ТРА 30 нМ. Желтый прямоугольник на панели А1 – область обработки экспериментальных данных по светорассеянию. Полоса масштаба 1 мм. На рисунке А4 показано пространственное распределение фибрина в отсутствие активатора плазминогена. На рисунке Б4 - распределение в присутствии ТРА 30 нМ. Черные, красные и синие линии показывают пространственное распределение сигнала светорассеяния (пропорционален концентрации фибрина) на 2-й, 10-й и 20-й минуте после запуска свертывания.

*Компьютерная модель роста и лизиса фибринового сгустка:* Была разработана компьютерная модель, описывающая процесс образования и лизиса фибринового сгустка. Общая схема модели отображена на рисунке 3. Моделирование проводилось в одномерной области длиной 3 мм с помощью программы Comsol 4.3 (Берлингтон, США). Рост сгустка был инициирован тканевым фактором, расположенным в точке  $x = 0$ . ТРА был равномерно распределен на всей области моделирования. При расчете схемы (рисунок 3) использовались уравнения Михаэлиса, связывающего скорость реакции, катализируемой ферментом, от концентрации субстрата.

Расчет процесса коагуляции был основан на компьютерной модели одномерного пространственного роста сгустка, разработанной в лаборатории физической биохимии системы крови НМИЦ гематологии и описанной в работах ранее (Шибeko А.М., 2009). «Фибринолитическая» часть модели совершенно новая. В модель были введены переменные концентрации ТРА, плазминогена в глу- и лиз-формах, плазмينا, в свободной, а также, в связанной с фибрином форме. Также были введены концентрации  $\alpha 2$ -макроглобулина,  $\alpha 2$ -антиплазмينا

и РАІ-1. Фибринолиз инициировался связыванием плазминогена и ТРА с фибрином, что приводило к образованию плазмина и деградации фибрина.



**Рисунок 3.** Пространственная кинетика генерации фибрина в отсутствие (А) и в присутствии (Б) ТРА в концентрации 50 нМ. Распределение фибрина в пространстве показано для 10-й (черная линия), 30-й (синяя линия) и 60-й (красная линия) минут симуляции. (В) Зависимость координаты фронта роста/лизиса сгустка от времени. (Г) Схема каскада свертывания крови, основные реакции. Зимогены изображены в виде синих кругов, активированные белки показаны желтыми кругами. Неактивные кофакторы показаны как синие прямоугольники, активированные кофакторы - как голубые. Красные стрелки показывают активацию, черные стрелки показывают переход от неактивной к активной форме и формирование комплексов. Зеленые стрелки показывают ингибирование. Двойная дуга - поверхность фосфолипидов, которая необходима для образования и активации комплексов. P<sub>g</sub>A - активатор плазминогена; FDP - продукты деградации фибрина.

Типичное уравнение поверхностных реакций для ТФ-иницированного свертывания крови:

$$\frac{d\sigma_{VII-TF}}{dt} = \left( k_a^{VII,TF} \cdot [VII] \cdot \sigma_{TF} - k_d^{VII-TF} \cdot \sigma_{VII-TF}^F \right) + \frac{k_{cat}^{VII-TF,IIa} \cdot \sigma_{VII-TF} \cdot [IIa^F]_{x=0}}{K_M^{VII-TF,IIa} + [IIa^F]_{x=0}} -$$

$$- k_{eff}^{VII-TF, Xa} \cdot \sigma_{VII-TF} \cdot [Xa^F]_{x=0};$$

Слева показано изменение концентрации неактивной внешней теназы ( $\sigma_{VII-TF}$ ) со временем. Согласно уравнению, она определяется двумя способами: 1) ассоциация и диссоциация TF с FVII (первое и второе слагаемые); 2) активация неактивной внешней теназы тромбином (третий член) и FXa (четвертый член).

Типичное уравнение объемных реакций:

$$\frac{\partial [TPA]}{\partial t} = D_{TPA} \cdot \frac{\partial^2 [TPA]}{\partial x^2} - k_i^{TPA, PAI1} \cdot [TPA] \cdot [PAI1] - k_a^{TPA, Fn} \cdot [TPA] \cdot ([Fn] - [TPA_B]) + k_d^{TPA_B} \cdot [TPA_B]$$

Слева показано изменение концентрации TPA со временем. Согласно уравнению, она определяется тремя процессами: 1) диффузией TPA (первое слагаемое); 2) ингибированием TPA PAI-1 (второе слагаемое); 3) ассоциацией и диссоциацией TPA с фибрином (третий и четвертый члены).

Поверхностные реакции генерируют поток активированных факторов, который задается как граничное условие для объемных реакций. Основываясь на известных концентрациях всех участников данных реакций в заданный момент времени и на кинетических константах, мы можем вычислить дальнейшую динамику коагуляции с использованием набора уравнений.

## Глава 3. Результаты

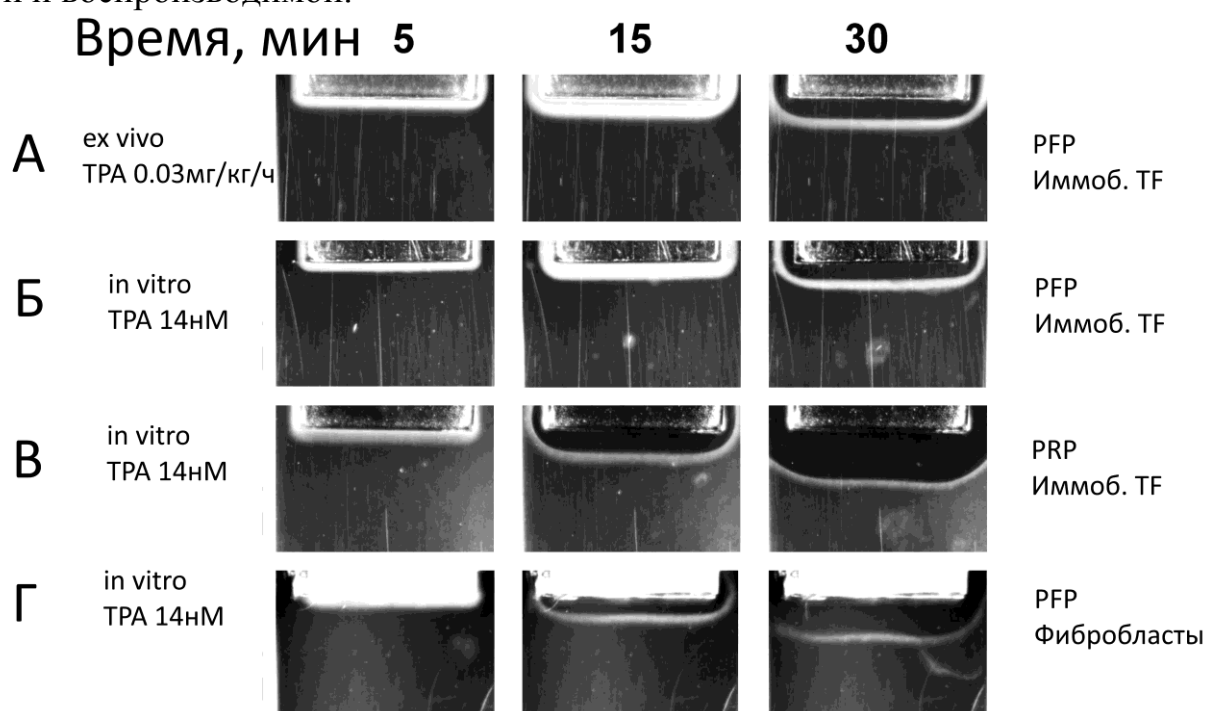
### 3.1. Пространственный лизис фибринового сгустка в присутствии активатора плазминогена начинается с области активации свертывания

Пространственная динамика образования сгустков в плазме у здоровых добровольцев, пациентов с гемофилией А, сепсисом (Ovanesov et al. 2003) показала, что в течение эксперимента (1 час) при отсутствии активаторов плазминогена, лизиса сгустка не происходит.

Рост сгустка *ex vivo* в PFP плазме у пациента, получающего фибринолитическую терапию рекомбинантным TPA (“Актилизе” от Boehringer Ingelheim) сопровождался одновременным лизисом: фронт лизиса образуется в области активации свертывания и следует за фронтом роста сгустка (рисунок 4 А).

Дизайн нашего эксперимента моделировал ситуацию, когда свертывание и лизис активировались в плазме одновременно. Мы попытались это реализовать в простой и воспроизводимой модели пространственного лизиса сгустка, в которой мы можем ставить любые начальные условия. Мы наблюдали фибринолиз в PFP плазме у пациента, получавшего TPA-терапию, а также у здоровых добровольцев, добавляя в плазму TPA *in vitro* (рисунок 4 Б).

Для исследования явления в условиях более близких к физиологичным, были также проведены эксперименты в богатой тромбоцитами плазме (PRP, 300 000 тромбоцитов/мкл). Мы обнаружили аналогичную картину пространственного лизиса сгустка (хотя скорости роста сгустка и распространения волны лизиса были выше, чем для PFP) (рисунок 4 В). Помимо этого, были проведены эксперименты активации свертывания в PFP с конфлюэнтным слоем фибробластов (рисунок 4 Г), в которых наблюдался аналогичный пространственный лизис (также с увеличением скорости роста и лизиса сгустка). Такой же результат был в PRP, в которой свертывание активировалось фибробластами. Исходя из полученных данных, все дальнейшие исследования проводились в PFP с активацией свертывания иммобилизованным TF, поскольку данная постановка была наиболее простой и воспроизводимой.



**Рисунок 4. Фотографии роста и лизиса фибринового сгустка в плазме крови через 5, 15 и 30 минут после начала эксперимента.** Серый прямоугольник в верхней части каждого изображения - вставка с иммобилизованным TF. Фибрин - белый, жидкая плазма - черная/темно-серая. (А) PFP пациента, получавшего TPA-терапию 0,03 мг/кг/ч. (Б) Пул PFP здоровых добровольцев, с добавлением TPA 14 нМ *in vitro*. (В) Пул PRP здоровых добровольцев, с добавлением TPA 14 нМ *in vitro*. (Г) Пул PFP здоровых добровольцев, с добавлением TPA 14 нМ *in vitro*, свертывание запускалось с помощью монослоя фибробластов на пластинке, содержащих TF. Показаны характерные эксперименты.

### 3.2. Характеристика пространственного роста и лизиса сгустка

Рост фибринового сгустка в отсутствие активаторов плазминогена в плазме начинался вблизи пластинки с иммобилизованным тканевым фактором и распространялся по объему плазмы (рисунок 2 А1-А3). На рисунке 2 А4 показана

зависимость интенсивности светорассеяния сгустка фибрина от расстояния до активирующей поверхности. Рост сгустка характеризуется крутым фронтом изменения интенсивности сигнала, который движется во времени с постепенно уменьшающейся скоростью (рисунок 2 А5). В присутствии ТРА в концентрации 30 нМ (рисунок 2 Б1-Б3) рост сгустка начался аналогичным образом, но после определенного времени происходило уменьшение сигнала светорассеяния, которое начиналось с той же области старта роста сгустка и распространялось в том же направлении. Для описания пространственного аспекта процесса использовались параметры: время задержки и скорость фронта волны свертывания (лизиса) (см. Материалы и методы).

### **3.3. Три типа волны лизиса сгустка**

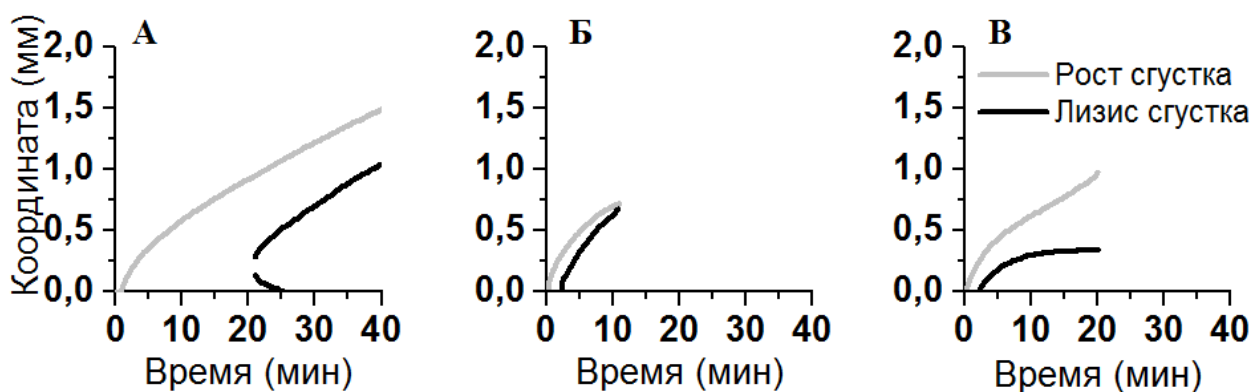
Для исследования зависимости параметров пространственного лизиса сгустка от концентрации тромболитического препарата в плазме, исследовалась зависимость скорости и времени задержки лизиса от концентрации ТРА. Было обнаружено, что в зависимости от концентрации ТРА, лизис может происходить по 3-м сценариям:

- 1) Лизис сгустка начинается на расстоянии около 200 мкм от активатора свертывания. Из данной области начинают распространяться в противоположных направлениях два фронта лизиса (ТРА 6 нМ (рисунок 5 А)). Для концентрации ТРА 6 нМ, данное событие происходило в 100% случаев (n=4), для 14 нМ – 73% (n=19), для 30 нМ – 11% (n=18). Для концентраций ТРА выше 30 нМ лизис сгустка всегда начинался с поверхности, несущей ТФ.
- 2) Лизис сгустка начинался с поверхности, несущей ТФ, фронт лизиса двигался за фронтом свертывания, сгусток полностью растворялся (ТРА 100 нМ (рисунок 5 Б));
- 3) Лизис сгустка начинался с поверхности, несущей ТФ, и, через некоторое время, останавливался, в то время как рост сгустка продолжался (ТРА 800 нМ (рисунок 5 С)). С помощью компьютерного моделирования (приложение 3) показано, что снижение фибринолитической активности при высоких концентрациях ТРА связано с ингибированием свободного плазмина и снижением концентрации плазминогена.

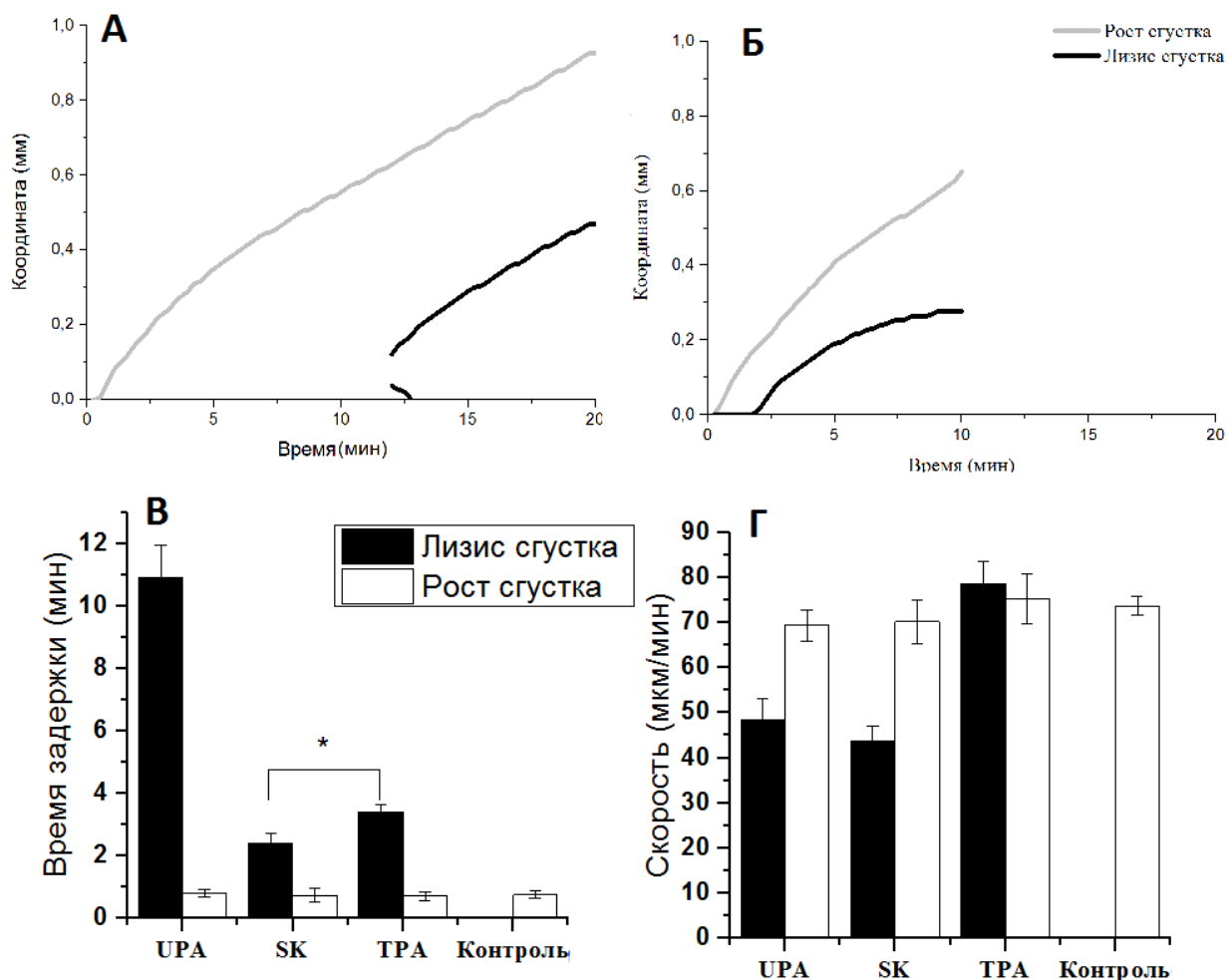
### **3.4. Пространственный лизис сгустка в присутствии различных тромболитических препаратов**

Концентрации активаторов плазминогена были выбраны в диапазонах, соответствующих концентрациям, используемым при фибринолитической терапии (ТРА 50 нМ, УРА 30 нМ, стрептокиназа (СК) 1200 нМ).

Схема распространения фронта лизиса сгустка для УРА (рисунок 6 А) была аналогична картине для низкой концентрации ТРА (рисунок 5 А): фронт лизиса образовывался примерно в 100 мкм от поверхности, несущей ТГ, и фиксировалось два фронта лизиса, распространяющихся в сторону активатора свертывания крови и от него. Данный результат может быть объяснен тем, что однопочечный УРА, использовавшийся в экспериментах, имел ограниченную активность в отношении плазминогена. Тип волны лизиса сгустка для СК (рисунок 6 Б) был аналогичен типу для экспериментов с высокой концентрацией ТРА (рисунок 5 В): лизис прекращался на некотором расстоянии от активатора свертывания крови, в то время как рост сгустка продолжался.



**Рисунок 5. Три типа волны лизиса сгустка.** Зависимость координат фронтов свертывания и лизиса от времени. Лизис сгустка начинался на расстоянии 200 мкм от поверхности активации свертывания крови в присутствии ТРА 6 нМ (А); полное растворение тромба наблюдалось в присутствии ТРА 100 нМ (Б); пространственный лизис сгустка останавливался на расстоянии 300 мкм от поверхности активации свертывания в присутствии ТРА 800 нМ (В). Показаны характерные эксперименты.



**Рисунок 6.** Пространственный лизис сгустка в присутствии 30 нМ UPA (А) и 1200 нМ SK (Б). Время задержки лизиса (В) для разных активаторов плазминогена. Скорость волны лизиса (Г). Свежезамороженная PFP плазма, дополненная активаторами лизиса: TPA 50 нМ (n = 9), UPA 30 нМ (n = 7) или SK 1200 нМ (n = 7); контроль (n = 7),

Таким образом, варьируя концентрации TPA, можно получить различные типы волн лизиса. А результаты экспериментов с SK и UPA укладываются в режимы, получаемые в экспериментах с TPA. В то же время, терапевтические концентрации UPA в данных экспериментах соответствуют “низким” концентрациям TPA, в то время как SK – “высоким”.

### 3.5. Концентрация TPA определяет начало лизиса и его скорость

Время задержки роста сгустка существенно не менялось с увеличением концентрации TPA (табл. 1, рисунок 7 А). Скорость роста сгустка составляла 73 - 78 мкм/мин в диапазоне концентраций [TPA] = 0 - 800 нМ (табл. 1, рисунок 7 Б). Таким образом, концентрация TPA не влияет на начало и скорость свертывания.

Время задержки лизиса сгустка уменьшилось с  $22 \pm 2$  мин при TPA 6 нМ до  $2,0 \pm 0,2$  мин для TPA 200 нМ и немного увеличилось до  $2,5 \pm 0,4$  мин при TPA 800 нМ (рисунок 7 А). Пространственная скорость лизиса сгустка увеличилась с

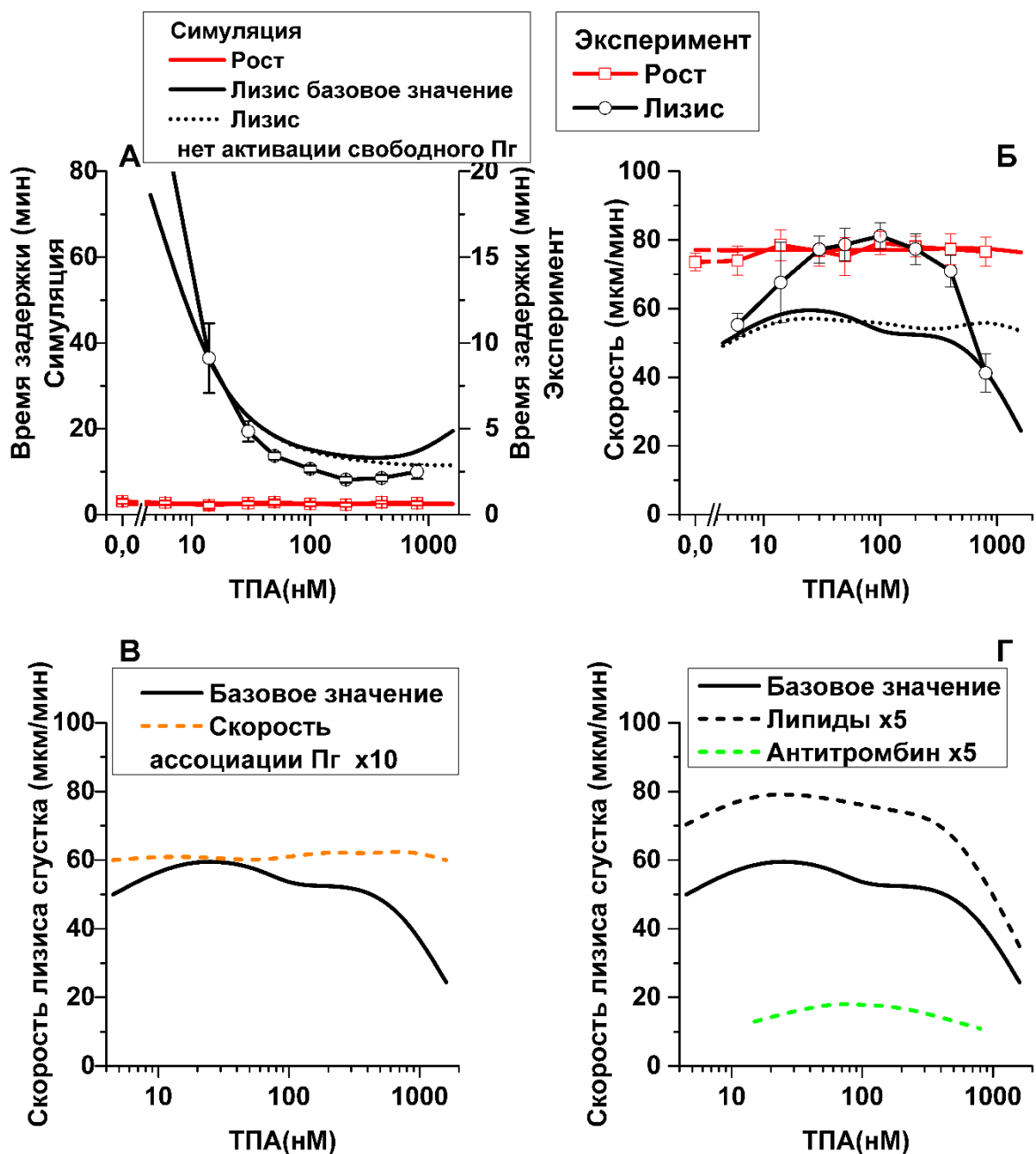
$55 \pm 3$  мкм/мин при ТРА 6 нМ до 75 - 78 мкм/мин для диапазона концентрации ТРА от 30 до 200 нМ и уменьшилась до  $41 \pm 5$  мкм/мин при ТРА 800 нМ (рисунок 7 Б).

### **3.6. Компьютерное моделирование роста и лизиса сгустка в пространстве**

Сравнение пространственной динамики образования фибрина в присутствии ТРА *in vitro* с моделью, разработанной в лаборатории, показало схожие результаты – фиксировалась волна лизиса, бегущая за волной свертывания, при росте концентрации ТРА лизис усиливается, затем начинает спадать, тогда как на свертывание существенного влияния не наблюдается (рисунок 7). В то же время, имеются некоторые различия, а именно: в экспериментах *in silico* лизис всегда стартовал с области активации свертывания, время задержки свертывания составляло 2,5 минуты ( $0,77 \pm 0,14$  мин *in vitro*), а скорость роста сгустка составляла 77 мкм/мин ( $74 \pm 2$  мкм/мин *in vitro*). В экспериментах *in silico* скорость лизиса сгустка при низких и высоких концентрациях ТРА хорошо коррелирует с результатами экспериментов *in vitro*, но для концентраций ТРА порядка десятков нМ выраженного увеличения скорости не наблюдается. Тем не менее, данные несоответствия в результатах *in silico* и *in vitro* оказали минимальное влияние на предмет данной работы – основные зависимости скоростей и времен задержек от концентрации тромболитического препарата, в случаях *in silico* и *in vitro* качественно совпадают (рисунок 7 А и Б).

Отключение в модели активации свободного плазминогена тканевым активатором (пунктирная линия) устраняло увеличение времени задержки и падение скорости лизиса при высоких концентрациях ТРА.





**Рисунок 7. Зависимость времени задержки и скоростей роста и лизиса сгустка от концентрации ТРА.** (А) Время задержки *in silico* (сплошные линии) было примерно в 4 раза выше, чем в эксперименте (линии с точками), как для роста сгустка (красные), так и для лизиса (черные). (Б) Скорость роста и лизиса сгустка. (В) Моделирование скорости связывания плазминогена с фибрином. (Г) Моделирование изменений в прокоагулянтном состоянии плазмы: добавление антитромбина III (увеличение в 5 раз по сравнению с базовым значением, зеленая пунктирная линия), или фосфолипидов (увеличение в 5 раз, черная пунктирная линия). PFP плазма (панели А и Б), дополненная ТРА в различных концентрациях (n = 4 - 11).

### **3.7. Скорости фибринолитических реакций оказывают незначительное влияние на скорость пространственного лизиса**

С помощью компьютерного моделирования были исследованы механизмы, регулирующие скорость распространения волны лизиса. При изменении значения скорости связывания плазминогена с фибрином, было обнаружено, что уменьшение скорости связывания вызывает прекращение лизиса (лизис не наблюдается в течение 90 минут эксперимента). Увеличение значения данного параметра (рисунок 7 В, пунктирная оранжевая линия) делало скорость распространения лизиса нечувствительной к изменению концентрации ТРА. Подавление пространственного лизиса сгустка (увеличение времени задержки и снижение скорости распространения волны лизиса) наблюдалось как *in vitro*, так и *in silico*. Симуляционный эксперимент показал, что высокая концентрация ТРА может вызвать активацию плазминогена во всей области моделирования, что приводит к снижению концентрации плазминогена.

В диапазоне концентраций ТРА 30-200 нМ, при которых не наблюдалось активации свободного плазминогена в степени, достаточной для его полного истощения в растворе, скорость лизиса сгустка была почти нечувствительна к изменению любых параметров фибринолиза.

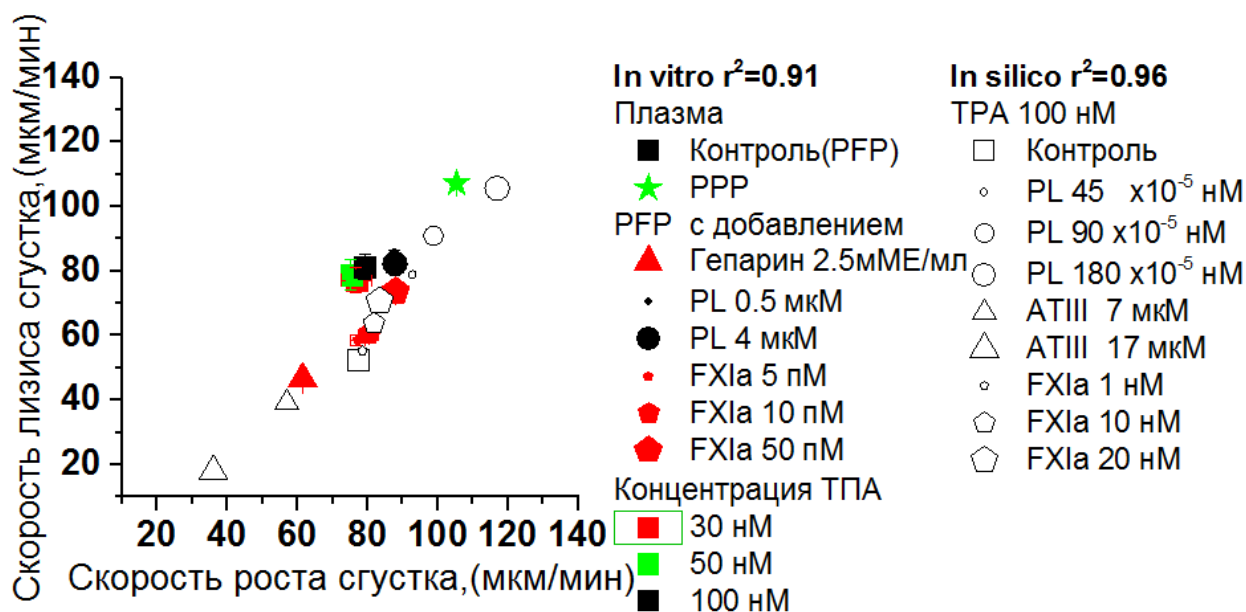
### **3.8. Скорость пространственного лизиса сгустка зависит от скорости распространения волны свертывания**

Была измерена скорость пространственного лизиса сгустка в системе с искусственной гиперкоагуляцией - при добавлении фосфолипидов (PL), скорость роста сгустка составляла 93 мкм/мин (рисунок 7 Г, черная пунктирная линия) и в системе с гипокоагуляцией - добавление дополнительного АТШ, скорость роста сгустка составляла 37 мкм/мин (рисунок 7 Г, зеленая пунктирная линия). Качественно, кривая дозозависимости скорости пространственного лизиса от концентрации ТРА была такой же, как и в контрольном эксперименте, но количественно скорости лизиса были выше в системе с PL и ниже в системе с АТШ.

Для анализа экспериментальных данных А.Шибeko были проведены *in silico* эксперименты (рисунок 8), моделирующие добавление в плазму 100 нМ ТРА, где была вызвана искусственная гиперкоагуляция путем добавления 1-20 нМ FXIa (черные пятиугольники) или  $(45 - 180) \times 10^{-5}$  нМ PL в конечной концентрации (черные круги), и эксперименты, в которых коагуляция была подавлена добавлением АТШ в конечной концентрации 7-17 мкМ (черные треугольники). Скорость лизиса сгустка показала хорошую корреляцию со скоростью роста сгустка ( $r^2 = 0,96$ ).

Кроме этого, были проведены эксперименты *in vitro* в PFP плазме (рисунок 8), дополненной 30 нМ, 50 нМ и 100 нМ ТРА для запуска лизиса; 0,5 или 4 мкМ

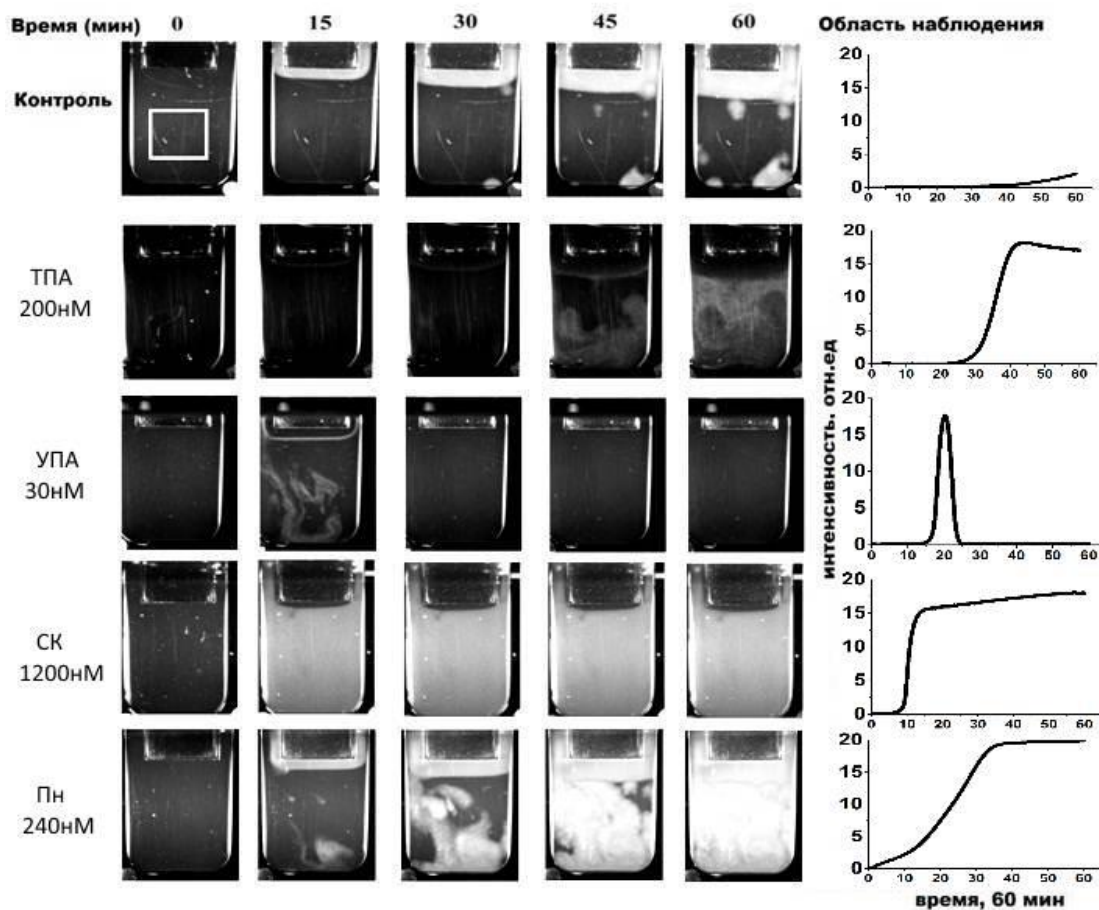
PL; или 5, 10 и 50 пМ FXIa для искусственной гиперкоагуляции; для моделирования гипокоагуляции в плазму был добавлен нефракционированный гепарин в конечной концентрации 0,0025 МЕ/мл (профилактическая концентрация). Также была измерена скорость пространственного лизиса в PPP, дополненной 50 нМ ТРА. Было обнаружено, что скорость пространственного лизиса сгустка коррелирует со скоростью роста сгустка ( $r^2 = 0,91$ ). Хотя результаты моделирования количественно расходились с экспериментальными результатами, качественное соответствие было очень высоким.



**Рисунок 8.** Скорость лизиса сгустка коррелирует со скоростью роста сгустка в математической ( $r^2 = 0,96$ , незакрашенные точки) и экспериментальной *in vitro* модели ( $r^2 = 0,91$ , покрашенные точки, N = 2 - 6).

### 3.9. Активация фактора IX плазмином

При добавлении высоких концентраций тромболитических препаратов в плазму, был обнаружен эффект гиперактивации системы свертывания по всему объему плазмы (рисунок 9). Были проведены эксперименты с основными тромболитическими препаратами – ТРА, УРА, СК, а также с плазмином. Во всех случаях добавления тромболитического препарата наблюдалась спонтанная активация плазмы по всему объему (с последующим лизисом в случае ТРА и УРА).

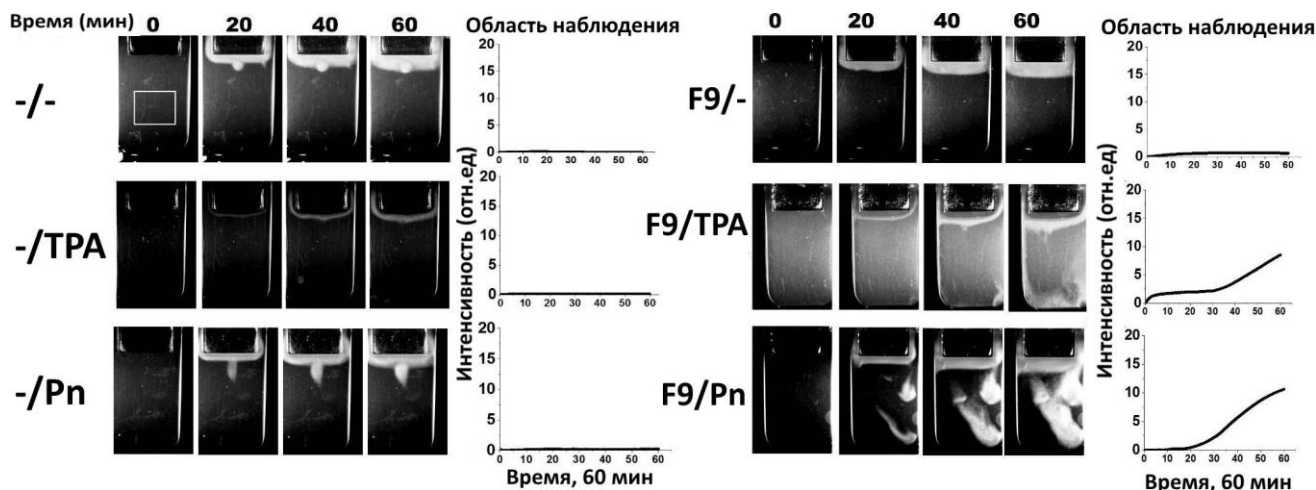


**Рисунок 9. Активация системы свертывания фибринолитическими препаратами.** По столбцам: время от начала эксперимента, мин (0, 15, 30, 45, 60); правый столбец характеризует изменение интенсивности от времени [интенсивность усреднена в области, удаленной от активатора на несколько мм (белый прямоугольник)]. Характерные эксперименты, N=6.

Так как активация свертывания происходила при добавлении любого активатора пламиногена, была предложена гипотеза, что свертывание активируется через плазмин.

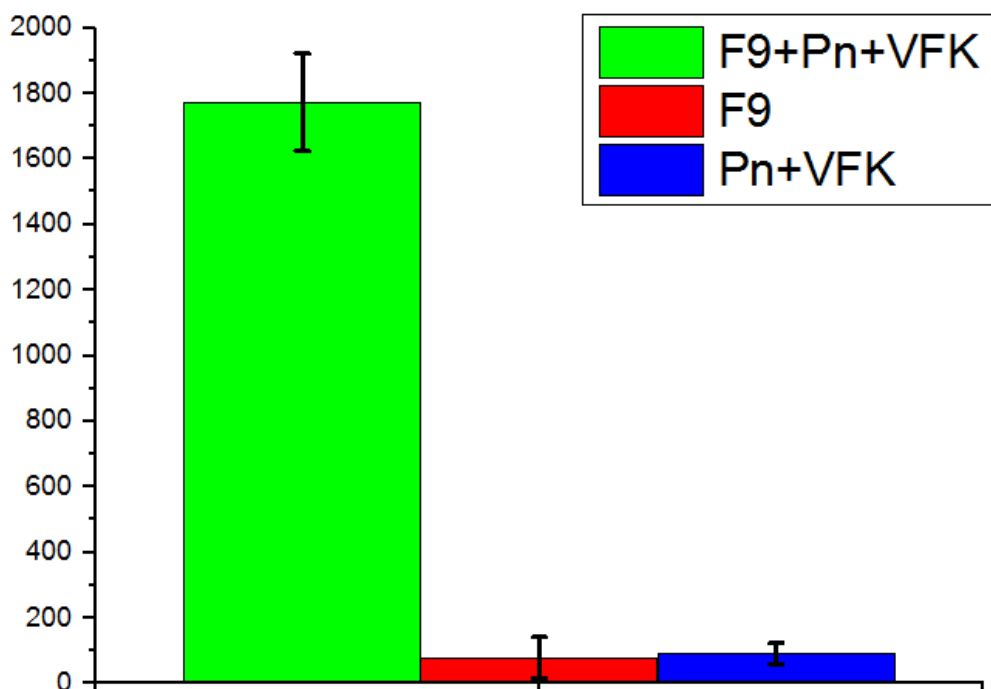
Дальнейшим шагом была задача определить фактор свертывания, который активируется системой фибринолиза. Для этого были поставлены эксперименты в плазмах, дефицитных по различным факторам свертывания.

На рисунке 10 изображены результаты экспериментов на плазме, дефицитной по фактору IX. При добавлении в такую плазму фибринолитических агентов (ТРА 400нМ и плазмина 720нМ) активации свертывания по объему плазмы не наблюдается. При восполнении плазмы фактором IX при добавлении тромболитических препаратов происходит активация свертывания. Эти результаты свидетельствуют о том, что фактор свертывания, отвечающий за активацию системы свертывания фибринолитиками, – это фактор IX или же фактор, лежащий выше по каскаду свертывания.



**Рисунок 10.** Исследование активации свертывания в дефицитной по фактору IX плазме. Эксперименты с добавлением в PFP плазму дефицитной по фактору IX фибринолитических препаратов (ТРА 400 нМ, Pn 720 нМ) и восполнением фактора IX (100нМ).

На основании полученных результатов был проведен эксперимент в буферном растворе, в котором фактор IX инкубировался с плазмином, после чего в раствор добавлялся препарат VFK-СМК - ингибитор плазмина.



**Рисунок 11.** Эксперимент по активации фактора IX плазмином с использованием флуорогенного субстрата S299 (субстрат на активированный фактор IX). Инкубация фактора IX 2400нМ с плазмином (Pn) 30нМ в течение 30 минут в буферном растворе (50 мМ HEPES, 0.15 М NaCl, рН 7.4). Последующее добавление VFK-СМК 1300нМ (ингибирование

плазмина, инкубация 10 мин). Добавление в раствор флуорогенного субстрата S299, запуск эксперимента. Время эксперимента 1ч, n=4. Планшетная флуориметрия.

Полученный раствор добавлялся в буфер с флуорогенным субстратом S299 на активированный фактор IX. Также были проведены контрольные эксперименты: фактор IX до инкубации с плазмином; плазмин с VFK-СМК, но без фактора IX. В отличие от контрольных экспериментов, в базовом эксперименте фиксируется значимый рост интенсивности флуоресценции, что свидетельствует об активации фактора IX плазмином (рисунок 11).

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В результате проведенной работы была разработана экспериментальная методика оценки параметров роста и лизиса фибринового сгустка в условиях, имитирующих ТЛТ терапию. Было установлено, что пространственный лизис в присутствии активатора плазминогена в терапевтических концентрациях начинается с области активации свертывания, что скорость лизиса линейно зависит от скорости распространения волны свертывания. При исследовании влияния различных концентраций ТРА (от единиц до тысяч нМ) на параметры пространственного лизиса было обнаружено три типа волны лизиса сгустка.

На основании проведенных в диссертационной работе исследований могут быть сделаны следующие выводы:

## **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ**

1. Разработана экспериментальная методика оценки параметров роста и лизиса фибринового сгустка в условиях, моделирующих ТЛТ на базе системы “Тромбодинамика”.
2. Обнаружено три типа волны лизиса сгустка в зависимости от концентрации ТРА (от единиц до тысячи нМ, по мере увеличения) – фронт лизиса, распространяющийся изнутри сгустка, фронт лизиса, распространяющийся от активирующей свертывание поверхности и, его частный случай, лизис, останавливающийся через несколько минут после старта.
3. Установлено, что в присутствии терапевтических концентраций ТРА (30-100 нМ), волна лизиса появляется на поверхности, активирующей свертывание крови, и распространяется в том же направлении, что и фронт роста сгустка, отделяя образующийся сгусток от поверхности, создавая риск отрыва сгустка.
4. Показано, что при увеличении концентрации ТРА до сотен нМ, время задержки лизиса уменьшается, скорость лизиса увеличивается, выходя на плато. При дальнейшем увеличении концентрации, время задержки лизиса начинает

увеличиваться, а скорость лизиса – спадать. Обнаружено явление остановки лизиса в плазме при концентрациях ТРА выше 1 мкМ (*in vitro*). С помощью компьютерного моделирования показано, что данное явление вызвано истощением свободного плазминогена.

5. Скорость движения фронта волны лизиса линейно зависит от скорости распространения волны свертывания.

6. Установлено, что при высоких концентрациях тромболитических препаратов в плазме происходит активация свертывания в результате реакции активации фактора IX плазмином.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Жалялов А.С.**, Пантелеев М.А. Экспериментальное исследование пространственной динамики фибринолиза *in vitro* в присутствии урокиназы и стрептокиназы. Ученые записки физического факультета. 2012. № 2. С. 2–6.
2. **Жалялов А.С.**, Баландина А.Н., Купраш А.Д., Шривастава А., Шибекко А.М. Современные представления о системе фибринолиза и методах диагностики ее нарушений. Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2017. Том: 16. Номер: 1. С: 69-82.
3. **Zhalyalov AS**, Panteleev MA, Gracheva MA, Ataullakhanov FI, Shibeko AM. Co-ordinated spatial propagation of blood plasma clotting and fibrinolytic fronts. PLoS One. 2017 Jul 7; 12(7).
4. **Жалялов А.С.**, Экспериментальное исследование пространственной динамики лизиса фибринового сгустка *in vitro*. Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам "Ломоносов-2012". 2012. С. 132–134.
5. **Zhalyalov A.**, Panteleev M., Ataullakhanov F., Shibeko A. Fibrinolysis wave propagation in a reaction-diffusive system. 38th FEBS Congress, St. Petersburg, 2013. SW 06, p 544.
6. **Жалялов А.С.**, Атауллаханов Ф.И., Пантелеев М.А. Экспериментальное исследование пространственной динамики лизиса фибринового сгустка *in vitro*. Материалы докладов IV съезда биофизиков России. Физика в медицине и экологии. 2012. С.88.
7. **Zhalyalov A.**, Shibeko A., Panteleev M., Ataullakhanov F. Spatial clot lysis rate is regulated by clot growth rate, XXIV International Society on Thrombosis and Haemostasis Congress, Amsterdam, 2013, p 321.
8. **Zhalyalov A.**, Panteleev M., Ataullakhanov F., Shibeko A. Fibrinolysis wave as a possible cause of rethrombosis, XXIV International Society on Thrombosis and Haemostasis Congress, Amsterdam, 2013, p 342.