

УДК 577.3

## ВЛИЯНИЕ РАСТВОРЕННОГО В КРОВИ ВОЗДУХА НА ДИНАМИКУ СВЕРТЫВАНИЯ *IN VITRO*

Зинченко А.А., Шаталов В.М.

Донецкий национальный университет  
e-mail: vladimir.shatalov@gmail.com

Поступила в редакцию 15.01.2010

Исследована динамика внутреннего и внешнего пути свертывания плазмы крови, из которой удалялся растворенный воздух с помощью сверхнормативного центрифугирования. Показано, что активности кровяной и тканевой протромбиназы немонотонно зависят от степени дегазации, максимумы активностей достигаются при полной дегазации плазмы, при этом время свертывания уменьшается вдвое. Результаты измерений времени свертывания в зависимости от концентрации запускающих свертывание ионов кальция свидетельствуют о том, что дегазация увеличивает химическую активность ионов кальция примерно на 0.1мМ.

**Ключевые слова:** кинетика, свертывание, плазма, кровь, центрифугирование, дегазация, протромбиназа, протромбин.

### ВВЕДЕНИЕ

Как известно, в воде при нормальных условиях содержится около 2% (объемных) растворенного воздуха, небольшая часть которого образует коллоид из микропузырьков. Для многих обитающих в воде организмов этот воздух является жизненно важным компонентом – источником кислорода. Кровь, как и другие биожидкости, также может содержать растворенные газы воздуха помимо того кислорода, что переносится гемоглобином. Очевидно, что часть этих газов может собираться в микропузырьки. В последнее время в литературе обсуждается проблема влияния растворенного воздуха на гидрофобное взаимодействие в водной среде, которое в биожидкостях ответственно за стабильность и функциональную активность белков. Интерес к этой проблеме связан, прежде всего, с поисками мишеней и механизма накопления слабых электромагнитных воздействий [1], однако изменение активности белков при удалении растворенного воздуха – проблема сама по себе интересная и малоизученная.

В работах [2,3] сообщается о необычных последствиях дегазации воды – улучшении ее моющих свойств. Дегазация воды влияет на гидрофобные силы, приводя к росту коэффициента поверхностного натяжения  $\sigma$  более чем на 5% [4]. Для сравнения, при нагреве от 20 до 60°C (температура денатурации некоторых белков)  $\sigma$  уменьшается всего на 10%.

В [5] показано, что продолжительность центрифугирования немонотонно влияет на скорость оседания эритроцитов и активность протромбиназы. Центрифугирование образцов дистиллированной воды приводит к возрастанию рН от 6.57 при 30°C до 7.25 при 36°C, что обусловлено дегазацией и выходом

углекислоты. Выход углекислоты означает, что по закону Дальтона из воды выходят также и другие газы воздуха. Таким образом, измеряя рН можно судить о степени дегазации воды.

Причина дегазации при центрифугировании довольно проста. Под действием центробежного давления происходит быстрое укрупнение микропузырьков за счет их слияния и десольватации газов из окружающего пузырек объема до его полного истощения. Микропузырьки всплывают на поверхность под действием выталкивающей силы Архимеда, которая во время вращения центрифуги увеличивается многократно за счет центробежного ускорения. Скорость всплытия ограничивается противодействующей силой вязкого трения и поэтому пропорциональна квадрату радиуса пузырька. Время максимальной дегазации при центрифугировании получается делением высоты столба жидкости на скорость всплытия. Дальнейшей возврат к равновесному рН происходит немонотонно в зависимости от степени дегазации. При малом времени центрифугирования всплытие пузырьков (и связанная с этим дегазация жидкости) продолжается и после остановки вращения, но с меньшей скоростью, что наблюдается как рост рН до предельного значения, соответствующего полной дегазации [5]. После остановки центрифуги и всплытия всего столба микропузырьков процесс поглощения воздуха становится преобладающим, что приводит к снижению рН до равновесного значения.

В настоящей работе мы используем дегазацию плазмы крови методом центрифугирования с целью получения более детальной информации о влиянии растворенного воздуха на функционирование белков свертывающей системы крови.

Как известно [6], имеются два основных пути запуска свертывания крови. Один из них считается внутренним, когда запуск осуществляется за счет ферментных факторов, содержащихся в самой крови или плазме, без участия тканевого тромбопластина. Запуск свертывания по этому пути начинается с активации контактного фактора XII [6], вслед за фактором XII последовательно активируются факторы XI, IX, VIII. Последние два фактора (IX и VIII) в присутствии ионов кальция и фосфолипидов осуществляют активацию фактора X, называемого *кровяной протромбиназой*.

Второй путь активации свертывания – внешний, поскольку он запускается поступлением из тканей в кровь тканевого тромбопластического фактора (фактора III), относящегося по природе к липопротеидам. Тромбопластический фактор, вступая во взаимодействие с фактором VII, при участии ионов кальция образует активатор фактора X, называемого *тканевой протромбиназой*.

В основе реакции свертывания лежат реакции гидролиза, осуществляемые протеолитическими ферментами. Реакции происходят на матрицах фосфолипидных мембран разрушенных эритроцитов и тромбоцитов, когда факторы свертывания фиксируются на мембранах при помощи ионов кальция [7]. При этом вопрос о влиянии растворенного воздуха на коагуляцию остается невыясненным.

Качественный анализ динамики внутреннего и внешнего путей системы свертывания был проведен в работах [8, 9]. Зависимость скорости процесса от концентрации кальция исследовалась в работах [10, 11]. Основной вывод этих работ состоит в том, что системы свертывания обладают пороговым поведением относительно активирующего воздействия ионов кальция, что связано с существованием в системе кальциевой регуляции. Интересно выяснить, как растворенный в крови воздух влияет на это пороговое поведение. С этой целью в настоящей работе была также экспериментально исследована динамика активации внешнего и внутреннего пути свертывания в неразбавленной свежей донорской плазме путем добавления свободного кальция в различных концентрациях.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты были выполнены на неразбавленной плазме, полученной из крови здоровых доноров с цитратным раствором, путем центрифугирования при 3000 об/мин при комнатной температуре. Нормативное время центрифугирования в соответствии с общепринятой методикой удаления тромбоцитов составляло  $t_d=15$  мин. Для дальнейшей дегазации плазма подвергалась дополнительной сверхнормативной обработке центрифугированием при 3000 об/мин. Центрифугирование, ускоряя всплытие микропузырьков под действием

многократно возрастающей силы Архимеда, приводит к выходу из жидкости растворенного воздуха. Время всплытия определяется вязкостью среды и размерами сосуда, характерное время полной дегазации пробирок с водой составляет порядка 50 мин [5].

Для определения времени свертывания внутреннего пути измерялось  $T_{in}$  – активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ), для чего использовался «АПТВ-Тест» фирмы «Технология-Стандарт», Россия. Для внешнего пути измерялось протромбиновое время  $T_{out}$  с помощью стандартного набора «Техпластин-Тест» той же фирмы. В обоих случаях при определении времени свертывания исследовалась обедненная тромбоцитами цитратная плазма, которую получали путем центрифугирования при 3000 об/мин. После очередного цикла центрифугирования из каждой пробирки осторожно отбирали в другую пробирку образцы супернатанта (верхнего слоя) – 2.5мл для определения АПТВ и 1мл для опыта с насыщением плазмы воздухом путем встряхивания.

Для измерения АПТВ в пробирку с 0.1мл исследуемой плазмы добавляли 0.1мл эритрофосфатид-каолиновой смеси, встряхивали и инкубировали в течение трех минут. После чего добавляли 0.1мл предварительно подогретого до 37°C раствора  $CaCl_2$ , имеющего концентрацию 0.025M, и начинали отсчет времени. Затем, вынимая пробирку из бани и слегка наклоняя ее, отмечали время образования сгустка  $T_{in}$ . Отсчет проводили дважды и брали средний результат. Далее плазму выдерживали в центрифуге при 3000об/мин до следующей точки по времени  $t_d$ .

Для измерения протромбинового времени  $T_{out}$  пробирку с 0.1мл исследуемой плазмы инкубировали при 37°C в течении одной минуты затем добавляли 0.2мл тромбопластин-кальциевой смеси, имеющей температуру 37°C и начинали отсчет времени свертывания  $T_{out}$  до образования фибрина. Измерение проводили в двух параллельных пробах и учитывали средний результат.

Для выявления порогового поведения свертывающей системы плазмы в зависимости от концентрации ионов кальция во все пробы добавлялся «Эрилид» – фосфолипидный препарат, выделяемый из мембран эритроцитов для стандартизации содержания коагуляционно-активной фосфолипидной поверхности в обедненной плазме [12]. Все добавки делались в буфере, содержащем 0.15 M трис-HCl, с pH=8.0. Свертывание запускалось добавлением в плазму раствора  $CaCl_2$  с концентрацией в диапазоне от 0.1 до 1.4 mM. Все измерения проводились при постоянном перемешивании и температуре 37°C.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Измерения времени свертывания плазмы по внутреннему пути  $T_{in}$  в зависимости от времени центрифугирования  $t_d$  были выполнены на четырех

образцах плазмы разных доноров. На рис. 1 представлены усредненные относительные результаты с указанием стандартных отклонений для каждой точки. На интервале  $15 < t_d < 25$  мин  $T_{in}$  резко возрастает до максимума в точке  $t_d = 25$  мин, а затем более плавно уменьшается, пересекая к исходное нормативное значение  $T_{in0}$  при  $t_d = 50$  мин (время полной дегазации согласно [5]). На интервале  $15 < t_d < 25$  мин  $T_{in}$  практически не меняется составляя половину от исходного значения  $T_{in0}$ .

На вставке к рис. 1 область максимума представлена более подробно. Кривая на вставке построена как усреднение результатов другой серии опытов, в которых исследовались два других образца плазмы. С этим связано ее отличие от кривой на рисунке, поскольку конкретные значения  $T_{in}$  немного разнятся для разных образцов плазмы. Отметим, что, несмотря на различие кривых, время достижения максимума примерно совпадает для обеих серий.

Как видно из рис. 1 (см. также вставку), 10 минут сверхнормативного центрифугирования приводят к значительному увеличению времени свертывания  $T_{in}$  или к уменьшению активности белков свертывающей системы. Суммарное время центрифугирования  $t_d = 25$  мин примерно соответствует диффузионным временам дегазации воды [5]. Для того, чтобы убедиться, что изменения времени свертывания образцов плазмы  $T_{in}$  после сверхнормативного центрифугирования обусловлены сопутствующей дегазацией, был проведен опыт с насыщением этих образцов воздухом – опыт со встряхиванием. После измерения  $T_{in}$  для  $t_d = 25$  мин (в области максимума, см. рис. 1) пробирка с 1 мл исследуемой плазмы плотно закрывалась пробкой и встряхивалась в течение 5-7 мин, после чего плазма отстаивалась при комнатной температуре 3-4 мин до оседания пены и снова измерялось  $T_{in}$ . Далее цикл встряхивания повторялся. Результаты опыта со встряхиванием приведены на рис. 2.

Как видно из рис. 2, эффект десятиминутного сверхнормативного центрифугирования полностью компенсируется после двух циклов встряхивания,  $T_{in}/T_{in0} = 1$ . По мере дальнейшего насыщения образца плазмы воздухом отношение  $T_{in}/T_{in0}$  уменьшается до нуля, при  $n > 4$  плазма свертывалась практически мгновенно, за 2-3 секунды. Это означает, что в течение  $t_d = 15$  мин нормативного центрифугирования происходит некоторая дегазация образцов, приводящая к увеличению  $T_{in0}$ . Кроме того, наблюдаемый экспоненциальный закон изменения  $T_{in}/T_{in0} \sim e^{-0.9n}$  соответствует общепринятым представлениям о переходе системы к равновесию на межфазной границе.

Таким образом, растворенный в плазме воздух является, на первый взгляд, необходимым компонентом для срабатывания системы свертывания крови по внутреннему пути. Однако дальнейший ход зависимости  $T_{in}(t_d)$  на рис. 1 менее понятен.

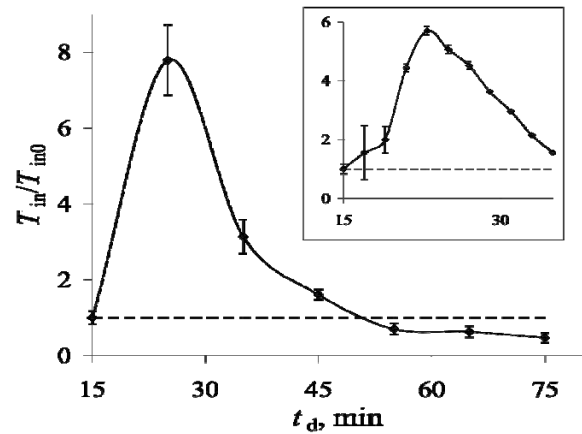


Рис. 1. Изменение времени свертывания по внутреннему пути  $T_{in}/T_{in0}$  (в отн. ед.,  $T_{in0}=0.61$  мин при  $t_d=15$  мин) при сверхнормативном центрифугировании,  $t_d > 15$  мин. Штриховая линия – исходное нормативное значение. На вставке – область максимума по результатам другой серии опытов.

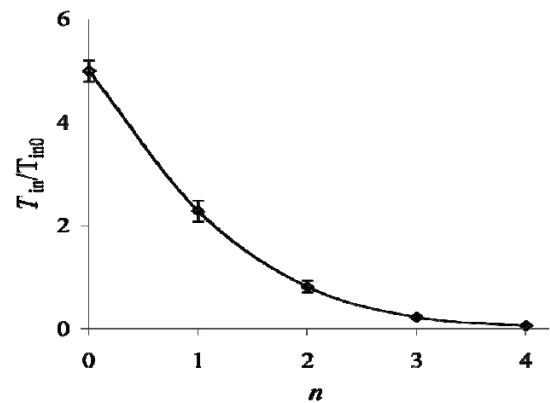


Рис. 2. Время свертывания по внутреннему пути  $T_{in}$  в зависимости от степени насыщения воздухом ( $n$  – число циклов встряхивания) после сверхнормативного центрифугирования в течении 10 мин (до  $t_d=25$  мин) по отношению к нормативному времени  $T_{in0}=0.7$  мин при  $t_d=15$  мин

Можно ожидать, что с ростом  $t_d$  воздух практически полностью выходит из плазмы, для воды это происходит при  $t_d > 50$  мин [5], а для плазмы, возможно, при  $t_d > 30$  мин. В таком случае ниспадающий участок кривой на рис. 1 обусловлен механизмами, не связанными с дегазацией. Так или иначе, как видно из рис. 1, максимум активности кровяной протромбиназы (минимум  $T_{in}(t_d)$ ) достигается при полной дегазации плазмы.

Совершенно иной вид имеет кинетика активации системы свертывания по внешнему пути. На рис. 3 представлены средние по трем образцам плазмы значения  $T_{out}(t_d)$  и соответствующие стандартные отклонения. Сначала с ростом  $t_d$  время свертывания уменьшается примерно вдвое от начального значения, максимальной скорость свертывания достигается при полной дегазации. Затем при  $t_d > 50$  мин характер кривой меняется на возрастающий. Так же как и для кровяной протромбиназы (рис. 1) максимум активности тканевой протромбиназы (минимум  $T_{out}(t_d)$ ) (рис. 3) достигается при полной дегазации плазмы.

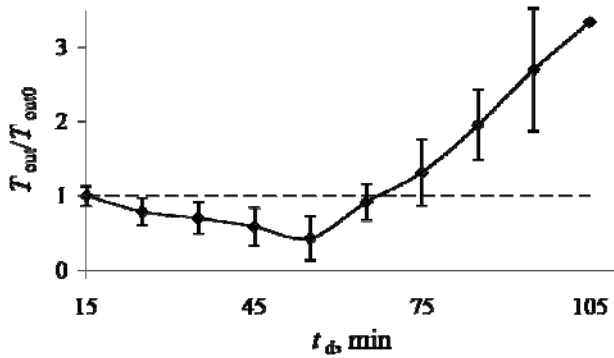


Рис. 3. Изменение времени свертывания по внешнему пути  $T_{out}/T_{out0}$  (в отн. ед.,  $T_{out0} = 0.4$  мин при  $t_d = 15$  мин) при сверхнормативном центрифугировании,  $t_d > 15$  мин.

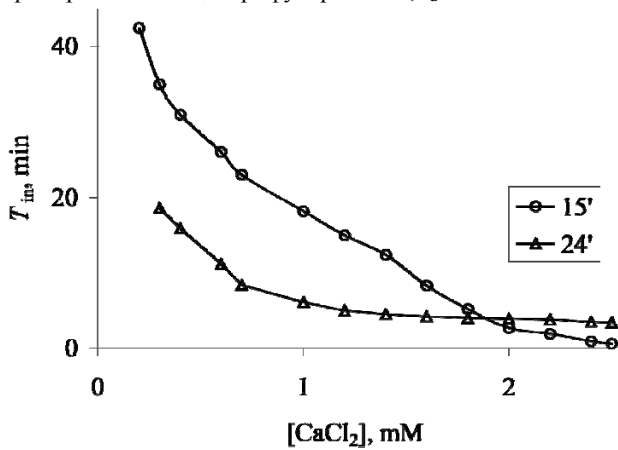


Рис. 4. Изменение времени свертывания по внутреннему пути  $T_{in}$  после центрифугирования в течении  $t_d = 15$  мин (o) и  $t_d = 24$  мин ( $\Delta$ ) в зависимости от концентрации добавляемого раствора  $CaCl_2$

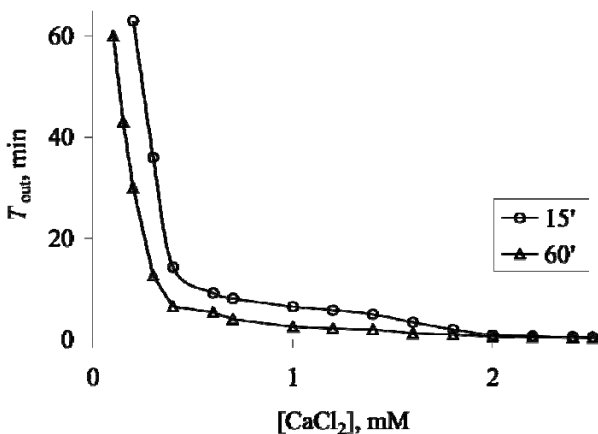


Рис. 5. Изменение времени свертывания по внешнему пути  $T_{out}$  после центрифугирования в течении  $t_d = 15$  мин (o) и  $t_d = 60$  мин ( $\Delta$ ) в зависимости от концентрации добавляемого раствора  $CaCl_2$

Некоторое сходство поведения кривых  $T_{in}(t_d)$  и  $T_{out}(t_d)$  в окрестности точки  $t_d = 50$  мин позволяет нам высказать предположение о том, что выход  $CO_2$  и соответствующий рост pH увеличивают активность ионов кальция, ускоряя таким образом фиксацию факторов свертывания на мембранах. Для проверки

этого вывода были измерены зависимости  $T_{in}$  и  $T_{out}$  от концентрации раствора  $CaCl_2$ , запускающего процесс свертывания плазмы. Полученные результаты для внутреннего и внешнего путей свертывания представлены на рис. 4 и рис. 5 соответственно.

На рис. 4 приведены зависимости времени свертывания по внутреннему пути  $T_{in}$  от концентрации добавляемого раствора  $CaCl_2$ . Эти кривые были получены для проб, отобранных из одного образца плазмы, которые центрифугировались  $t_d = 15$  мин и  $t_d = 24$  мин и, следовательно, отличались степенью дегазации. Относительную ошибку этих измерений можно оценить как модуль разности ординат соседних точек, деленный на их сумму. Среднее значение относительной ошибки составило 16% для кривой  $t_d = 15$  мин и 7% для  $t_d = 24$  мин. Как и в работе [10], здесь имеется пороговая концентрация кальция примерно 0.2 мМ, ниже которой свертывание не наступает. Видно, что дегазация плазмы снижает примерно вдвое время свертывания на интервале концентраций  $0.2 < [CaCl_2] < 1.8$  мМ.

Такой же эффект от дегазации наблюдается и для концентрационных зависимостей времени свертывания по внешнему пути  $T_{out}$ , рис. 5. Пробы, отобранные из одного образца плазмы отличались степенью дегазации, время центрифугирования составляло  $t_d = 15$  мин и  $t_d = 60$  мин.

Среднее значение относительной ошибки составило 21% и 19% соответственно. Здесь пороговое поведение кривых имеет ярко выраженный характер. Как видно из рис. 5, центрифугирование в течении 60 мин, во-первых, уменьшает пороговое значение концентрации  $Ca^{++}$  примерно на 0.1 мМ, а во-вторых – уменьшает время свертывания во всем диапазоне концентраций  $Ca^{++}$  более, чем вдвое. Удивительно, что после часа выдержки в центрифуге свертывающая система крови все еще сохраняет свою работоспособность.

Сравнивая кривые на рис. 4 и рис. 5 можно заметить, что в области  $0.5 < [CaCl_2] < 1.5$  мМ наблюдается примерно параллельный сдвиг по оси абсцисс. Кривые с большими  $t_d$  сдвинуты относительно соответствующих кривых с меньшими  $t_d$  примерно на 0.1 мМ, что можно объяснить эффективным увеличением концентрации, то есть увеличением активности ионов  $Ca^{++}$  при дегазации. Часть растворенного в плазме воздуха собирается в микропузырьки, которые, как известно [1], являются ловушками для свободных ионов, уменьшая тем самым их активность. Дегазация удаляет эти ловушки, и активность ионов возрастает.

## ВЫВОДЫ

Исследование динамики свертывания плазмы показало, что активность свертывающей системы зависит от концентрации растворенного в плазме воздуха немонотонно. С ростом дегазации время свертывания по внутреннему пути резко растет, а по

внешнему – падает. Однако максимальная дегазация приводит к максимальной активности свертывающей системы, что связано с возрастанием по мере удаления воздуха активности ионов кальция, инициирующих свертывание.

Следует отметить, что рассматривая дегазацию при центрифугировании как причину изменения наблюдаемых свойств крови мы опирались лишь на общефизические соображения, приведенные во введении, и на косвенные свидетельства того, что дегазация имеет место. Это известные изменения свойств воды при центрифугировании [5], а также описанные выше результаты опытов со встряхиванием центрифугированных образцов, когда после насыщения воздухом активность свертывающей системы крови возвращалась к исходному значению. В дальнейшем предполагается провести количественные измерения содержания разных газов в образцах после центрифугирования.

### Литература

1. Шаталов В.М. Дегазация биожидкостей как механизм биологического действия слабых электромагнитных полей // *Біофізичний Вісник*. – 2009. – Вып. 23(2). – С. 120-128.
2. Pashley R.M., Rzechowicz M., Pashley L.R., Francis M.J. De-Gassed Water Is a Better Cleaning Agent // *J. Phys. Chem. B*. – 2005. – Vol.109. – P.1231-1238.
3. Pashley R.M., Francis M.J., Rzechowicz M. The hydrophobicity of non-aqueous liquids and their dispersion in water under de-gassed conditions // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* – 2008. – P.236-244.
4. Ковеза Ю.В., Нога И.В., Шаталов В.М. Изменение кислотности и дегазация среды как факторы, влияющие на гидрофобное взаимодействие и активность растительной каталазы // *Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона*. – 2008. – №8. – С. 290-292.
5. Зинченко А. А., Нога И. В., Шаталов В. М. Влияние дегазации при центрифугировании на некоторые показатели крови // *Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона*. – 2009. – №9. – С. 15-18.
6. Воробьева А. И. Руководство по гематологии. – М.: 1979. – С.110-118.
7. Филимонов В. И. *Нормальная физиология*. – К.: Здоровье, 1994. – с. 272-283.
8. Ханин М.А., Семенов В.В. // *Биофизика*. – 1990. – Т.35, №1. – С.139.
9. Khanin M. A., Semenov V.V. // *J.Theor. Biol.* – 1986. – V136. – P.127.
10. Атауллаханов Ф.И., Волкова Р.И., Похилко А.В., Синауридзе Е.И. Пороговое поведение системы свертывания крови при изменении концентрации кальция // *Биофизика*. – 1994. – Т. 39, вып. 4. – С.713-719.
11. Атауллаханов Ф.И., Молчанова Д.А., Похилко А.В. Имитационная математическая модель внутреннего пути свертывающей системы крови // *Биофизика*. – 1995. – Т. 40, вып. 2. – С.434-442.
12. Козлов А.А., Барковский А.Л., Бовенко В.Н., Пичугина Н.Е. // Патент России №1790604, выдан 22.09.92.

### ВПЛИВ РОЗЧИНеноГО В КРОВІ ПОВІТРЯ НА ДИНАМІКУ ЗГОРТАННЯ *IN VITRO*

**Зінченко А. О., Шаталов В. М.**

Досліджена динаміка внутрішнього і зовнішнього шляхів згортання плазми крові, з якої видалялося розчинене повітря за допомогою наднормативного центрифугування. Показано, що активності кров'яної і тканинної протромбіназ немономонно залежать від ступеня дегазації, максимуми активності досягаються при повній дегазації плазми, при цьому час згортання зменшується вдвічі. Результати вимірів часу згортання залежно від концентрації іонів кальцію, що запускають згортання, свідчать про те, що дегазация збільшує хімічну активність іонів кальцію приблизно на 0.1 мМ

**Ключові слова:** динаміка, згортання, плазма, кров, центрифугування, дегазация, протромбіназа, протромбін.

### AIR DISSOLVED IN BLOOD EFFECT ON THE BLOOD CLOTTING DYNAMICS *IN VITRO*

**Zinchenko A. A., Shatalov V. M.**

Changes in dynamics of the internal and external ways of the blood plasma clotting via dissolved air by means of additional centrifugation is investigated. It is shown, that activities of the blood and fabric prothrombinases has non-monotonic dependence on the degassing degree, the activities maxima are reached at full degassing of plasma, thus time of curtailing decreases twice. Results of measurements of curtailing time via concentration of the calcium ions which activate curtailing testify that degassing increases the chemical activity of the calcium ions in 0.1mM.

**Key words:** dynamics, blood plasma clotting, centrifugation, degassing, prothrombinase, prothrombin.