

УДК 577.3

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ: ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2023 г. Д.Ю. Нечипуренко^{*, **, ***, #}, М.А. Пантелеев^{*, **, ***, ****}, Е.И. Синауридзе^{**, ***, **},
К.С. Троянова^{*, **, **}, А.Д. Мегалинский^{**}, Н.А. Подоплелова^{**, ***, **}, А.М. Шибeko^{**, ***, **},
А.Н. Баландина^{**, ***, **}, Е.В. Кольцова^{**, ***, **}, Ф.И. Атауллаханов^{*, **, ***, ****}

^{*}Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские Горы, 1/2, Москва, 119991, Россия

^{**}Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,
Средняя Калитниковская ул., 30, Москва, 109029, Россия

^{***}Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии
имени Д. Рогачева, ул. Саморы Машела, 1, Москва, 117997, Россия

^{****}Московский физико-технический институт (государственный университет),
Институтский пер., 9, Москва, 115184, Россия

[#]E-mail: ne4ipur@gmail.com

Поступила в редакцию 14.07.2022 г.

После доработки 14.07.2022 г.

Принята к публикации 03.11.2022 г.

Свертывание крови является важнейшим физиологическим ответом организма на нарушения целостности или функции сосудистой стенки. Данный процесс является нестационарным, обладает множеством не до конца установленных механизмов пространственной регуляции, а его понимание крайне необходимо для предотвращения большого количества жизнеугрожающих состояний. Данный обзор посвящен истории исследования процессов свертывания крови коллективом ученых-биофизиков, – выпускников и сотрудников кафедры биофизики физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, усилиями, которых удалось создать одну из ведущих российских научных школ по экспериментальному и теоретическому исследованию системы гемостаза. В обзоре описаны основные направления исследований, которые включили множество разнообразных аспектов проблемы – от развития теоретических моделей свертывания крови до разработки и клинических исследований новых методов оценки состояния гемостаза.

Ключевые слова: гемостаз, свертывание крови, фибрин, тромбин, тромбоциты.

DOI: 10.31857/S0006302923010076, EDN: NZRQEZ

Система гемостаза, отвечающая за остановку кровотечений и поддержание естественного гомеостаза и циркуляции крови, обладает способностью быстро и эффективно отвечать на широкий спектр возможных повреждений сосудистой стенки: от быстрого «затыкания» нарушенных эндотелиальных контактов отдельными тромбоцитами (такие «прорехи» могут быть вызваны усиленной миграции клеток иммунной системы в ткани при воспалении), до формирования крупных гемостатических пробок, останавливающих острое кровотечение в случае серьезных повреждений сосудов. Нарушения в работе данной си-

стемы приводят к опасным состояниям – кровотечениям и тромбозам. В соответствии с печальной статистикой, осложнения, вызванные одними артериальными тромбозами – инфаркты и ишемические инсульты – являются лидирующей причиной смерти и инвалидности, как в России, так и далеко за ее пределами.

Изучение свертывания крови насчитывает уже многие десятилетия, однако отсутствие понимания принципиальных механизмов, регулирующих гемостатический ответ в норме, приводит к отсутствию надежных инструментов для диагностики и коррекции многообразных нарушений свертывания.

В системе гемостаза выделяют два звена: первичный гемостаз (сосудисто-тромбоцитарный) и вторичный, – включающий каскад биохимических реакций, приводящих к желированию плаз-

Сокращения: АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, ПЗР – плазмозамещающие растворы, ТПА – тканевый активатор плазминогена, РА1-1 – ингибитор активатора плазминогена 1,

мы за счет формирования фибриновой сети. Такое разделение вызвано классическими представлениями, согласно которым в условиях потока крови вначале происходит формирование тромбоцитарного агрегата (то есть срабатывает клеточное звено гемостаза), после чего данный агрегат стабилизируется фибрином, который действует как клей и не только меняет локальное агрегатное состояние плазмы крови, но и надежно прикрепляет сформированный сгусток к сосудистой стенке.

Физиологические задачи системы гемостаза диктуют необходимость порогового поведения в плане инициации ответа (с целью предотвращения ошибочного запуска реакций свертывания), а также наличия механизмов, ограничивающих данный ответ в пространстве в случае его запуска (во избежание неограниченного распространения сгустка, которое может иметь смертельные последствия для организма).

Выявление механизмов, регулирующих инициацию гемостатического ответа, его распространение в пространстве и остановку, стало одним из ключевых направлений исследований команды биофизиков, которые под руководством Ф.И. Атауллаханова в начале девяностых годов прошлого века приступили к работе на базе Гематологического научного центра РАМН. Следует отметить, что данная работа была во многом мотивирована замечательным человеком, выдающимся врачом и организатором — академиком А.И. Воробьевым, который в то время возглавлял Гематологический научный центр.

В данном обзоре кратко описана история научных поисков, открытий и неудач, которые сопутствовали исследованию данной научной группы, со временем превратившейся в одну из крупнейших научных школ по изучению гемостаза в России.

ФЕНОМЕНОЛОГИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ СВЕРТЫВАНИЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Процесс образования фибринового сгустка в плазме крови обладает ключевыми свойствами, характерными для активных сред [1–3]: наработка тромбина и, как следствие, полимеризация фибрина может происходить во всем объеме, занимаемом плазмой крови, а каскад биохимических реакций свертывания имеет множество положительных обратных связей, которые могут приводить к самоактивации процесса. Таким образом, в данной системе есть все компоненты, необходимые для автоволнового роста тромба. Однако даже в упрощенных *in vitro* системах фибриновый сгусток никогда не растет на сколь угодно большие расстояния.

Теоретические исследования, выполненные под руководством Ф.И. Атауллаханова, позволили сформулировать гипотезу, согласно которой плазма крови является активной средой нового типа [4–9], в которой могут генерироваться не только классические автоволны, но и так называемые автоволны с остановкой [6, 10]. Рассмотренные феноменологические математические модели, формализующие ключевые представления о свертывании, описывают плазму крови как активную среду, в которой наряду с классическими решениями, могут существовать новые динамически и стационарные объекты: автоволны с меняющейся амплитудой [6, 10], а также разнообразные кольцевые структуры и «пятна» — стационарные неизотропные распределения веществ в пространстве [11–14].

Следует отметить, что спектр возможных пространственно-динамических режимов поведения предложенной феноменологической модели свертывания, описываемой всего тремя нелинейными дифференциальными уравнениями типа «реакция–диффузия», оказался крайне разнообразным и в настоящее время остается недостаточно изученным. Теоретический анализ моделей такого рода представляет интерес не только для исследования свертывания крови, но и для широкого круга задач, в том числе выходящих за рамки биологии.

ДЕТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ СВЕРТЫВАНИЯ ПЛАЗМЫ

Уже на самых первых этапах исследования пространственной регуляции свертывания крови стало ясно, что простые феноменологические модели могут позволить проверку принципиальной работоспособности тех или иных гипотез (в частности, автоволновой и пороговой концепций), но недостаточны для исследования конкретных молекулярных механизмов и сравнения с экспериментальными данными. Работа над детальными моделями свертывания для этих целей началась в нашей команде почти сразу же. Первая версия такой модели, созданная Атауллахановым и соавторами, была опубликована в журнале «Биофизика» в 1995 г. [15]. В отличие от всех предыдущих работ, она сразу фокусировалась на внутреннем пути свертывания, играющем ключевую роль в автоволновой гипотезе. Эта модель была «гомогенной», т.е. фокусировалась на биохимии свертывания и рассматривала его в однородном пространстве.

Следующий принципиальный шаг был сделан в работах [16, 17], авторы которых перенесли эту модель в пространственно-распределенную систему и показали, что в ней может существовать автоволна. В рамках стандартной биохимии свертывания она не останавливалась, поэтому в нее

были введены дополнительные гипотезы о переключении тромбина в «антикоагулянтный» режим одним из отщепляемых пептидов. Эти гипотезы в комбинации с упрощениями привели к новому поколению редуцированных автоволновых моделей свертывания [18]. Однако предложенная в работах [16, 17] модель продолжала базироваться на активации по контактному пути: для автоволновой фазы это не было существенно, и первые эксперименты ставили с активацией свертывания стеклом. Тем не менее, со временем в той же лаборатории начали разрабатываться новые экспериментальные подходы для исследования свертывания крови при активации по физиологическому пути, тканевым фактором [19].

Для решения этой проблемы в начале 2000-х годов началась работа по разработке модели нового поколения, с улучшенной биохимией и активацией по внешнему пути. Были выполнены отдельные проекты по детальному исследованию отдельных блоков свертывания [20–22], и в конце концов эта работа была опубликована в 2006 г. [23]. Предложенная модель была тщательно валидирована на всех уровнях организации и включала все ключевые реакции свертывания, известные на тот момент [24, 25]. Она позволила подвести молекулярную базу под роль внутреннего пути в пространственной динамике свертывания крови, а также предсказала остановку пространственного роста свертывания в присутствии тромбомодулина, успешно подтвержденную в эксперименте. К отрицательным результатам модели можно было отнести тот факт, что хотя в этой модели присутствовала активация фактора XI тромбином и ее вклад в рост сгустка был достоверным, он казался достаточно слабым, значимую «чистую» автоволну показать не удавалось, в том числе в экспериментах. Эта работа далее развивалась в следующих направлениях.

Во-первых, дальнейшие исследования регуляции свертывания крови под руководством Ф.И. Атауллаханова в значительной степени использовали разные варианты этой модели. Основные вехи на этом пути:

- 1) Роль активации фактора V в регуляции порогов по активации [26, 27];
- 2) Роль активации фактора VII в регуляции порога по скорости потока [28];
- 3) Роль ингибитора пути тканевого фактора в управлении порогом и динамикой свертывания [29, 30];
- 4) Полноценное экспериментальное доказательство и теоретическое исследование автоволнового феномена свертывания крови [31];
- 5) Механизмы устойчивости системы свертывания к возмущениям [32].

Эти исследования привели к формированию новой картины регуляции свертывания, которая

подтверждена экспериментально *in vitro*. Ее важнейшим недостатком сейчас является отсутствие данных *in vivo*.

Во-вторых, исследования биохимии процесса свертывания, предпринятые для этих моделей, привели к формированию новых направлений в коллективе — по изучению механизмов мембранных реакций, формированию прокоагулянтных тромбоцитов и далее, по мере развития тромбоцитарного направления, по исследованию формирования тромбоцитарного тромба.

МЕТОД РЕГИСТРАЦИИ ПРОСТРАНСТВЕННОГО СВЕРТЫВАНИЯ (ТРОМБОДИНАМИКА): ОТ КОНЦЕПЦИИ К ИСПЫТАНИЯМ В КЛИНИКЕ

Первые экспериментальные работы, в которых свертывание крови рассматривалось как пространственно неоднородный процесс, начинающийся в месте его активации и распространяющийся на определенное расстояние, были опубликованы в лаборатории в 1995–1998 гг. В работах [4, 33] были приведены эксперименты, демонстрирующие рост фибринового сгустка от стеклянных шариков, выступающих в роли активатора свертывания. В дальнейшем методика активации свертывания была усовершенствована: активацию проводили по внешнему пути от монослоя фибробластов на подложке, которая располагалась на одной из граней измерительной кюветы [19]. В этот момент стало ясно, что метод позволяет не только изучать принципы устройства системы свертывания в норме, но также проливает свет на механизмы, лежащие в основе некоторых патологических состояний. Так, до этого дефицит факторов свертывания VIII и XI (гемофилия А и С соответственно) традиционно определяли в клинических лабораториях, измеряя время свертывания при активации по внутреннему пути (тест активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ)), тогда как активация по внешнему пути (тест протромбинового времени) у таких пациентов была в норме, несмотря на тяжелые хронические кровотечения. Однако при повреждении сосуда в организме запускается именно активация по внешнему пути, что ставит вопрос об адекватности лабораторных тестов. Именно рассмотрение активации и роста сгустка в пространстве показало, что у таких пациентов изначально вблизи активатора быстро формируется нормальный сгусток, однако впоследствии этот сгусток становится неплотным, приобретает размытые границы (в отличие от нормального сгустка с очень четкой границей между самим сгустком и жидкой плазмой) и растет значительно медленнее, что приводит к выводу о том, что нарушена фаза роста сгустка [19]. При этом было показано [34], что сама фаза акти-

вазии достаточно слабо влияет на последующий рост сгустка, он скорее определяется свойствами среды (составом плазмы крови), а не уровнем активации. В дальнейшем было обнаружено [23], что за активацию свертывания отвечает только внешняя теназа, а распространение сгустка контролируется генерацией фактора Ха с помощью внутренней теназы. Остановить рост сгустка можно с помощью ингибитора свертывания тромбомодулина, в норме локализованного на здоровом эндотелии сосудов. Тем самым задается парадигма функциональных блоков, регулирующих отдельные свойства системы свертывания крови. Кроме этого, исследование пространственного роста сгустка позволило сделать важное предположение о механизмах действия гемостатического препарата фактора VIIa [35]. Было показано, что действие рекомбинантного фактора VIIa не ограничивается взаимодействием с поверхностью поврежденной стенки сосуда с тканевым фактором и преимущественно определяется независимым от тканевого фактора механизмом, однако зависит от присутствия микровезикул, что выражается в увеличении скорости роста сгустка и возникновении спонтанного тромбообразования вдали от фронта роста сгустка. Таким образом, независимое от тканевого фактора действие VIIa обеспечивает быстрое образование тромба вокруг места повреждения. Современные технологии, такие как применение светодиодов для освещения экспериментальной кюветы, качественные фильтры для флуоресцентного сигнала от «метки» тромбина и высокое разрешение фотокамеры позволили улучшить получаемые данные и впервые получить не только распределение фибрина, но и распределение тромбина в пространстве и продемонстрировать его волновую природу [31]. Следующим большим методологическим прорывом в этой области стала разработка стандартизованного активатора, представляющего собой иммобилизованный на пластиковую поверхность тканевый фактор [36]. Усовершенствование технологии создания активаторов и измерительной установки, а также предварительные данные клинической апробации привело к выдвиганию разработки в конкурсе РОСНАО и получению финансирования на промышленное производство диагностической системы и теста «Тромбодинамика».

Равномерность нанесения, возможность создания большого количества образцов, стабильность и воспроизводимость характеристик позволили проводить более масштабные исследования, в том числе на пациентах. Так, было обнаружено [37], что у пациентов в состоянии сепсиса и септического шока скорость роста сгустка повышалась за несколько дней до увеличения концентрации D-димеров (продукта распада фибрина вследствие лизиса сгустка), что расценивается

как показатель развития тромбоза. Таким образом, метод измерения пространственного роста сгустка стал рассматриваться как потенциально полезный в клинической практике метод ранней диагностики нарушений свертывания. При этом выяснилось, что важной особенностью свертывания, проявившейся при учете пространственной неоднородности, стало спонтанное тромбообразование: даже если избавиться от «паразитной» контактной активации от стенок измерительной кюветы с помощью добавления ингибитора, у пациентов с протромботическими нарушениями свертывания часто регистрируются сгустки по всему объему плазмы, вне зоны активации и роста сгустка [37, 38].

Поскольку основной пул методов, находящихся в распоряжении медицинских лабораторий, предназначен в основном для диагностики нарушений свертывания, ассоциированных с кровоточивостью, а для диагностики риска тромбоза надежных методов так и не было разработано, исследования тромбодинамики в клинике были сосредоточены вокруг двух основных тем — диагностики тромбогенных (или, по-другому, гиперкоагуляционных состояний) и контроля терапии антикоагулянтами, которые применяются для коррекции таких состояний.

Для диагностики гиперкоагуляционных состояний набирали группы пациентов с высоким риском развития тромбоза и сравнивали с группой здоровых добровольцев. Сдвиг параметров теста тромбодинамики в сторону гиперкоагуляции был обнаружен после различных оперативных вмешательств [39, 40], при инфекционных заболеваниях [41], беременности [40, 42], бесплодии [43], онкологических заболеваниях [44, 45], состояниях после уже произошедшего тромбоза [45], у пациентов детского возраста с редкими заболеваниями гематологического профиля [46–48] и новорожденных детей [49]. Помимо регистрации гиперкоагуляции в группах высокого риска тромбоза также ряд исследований показал предиктивную способность теста в отношении тромботических осложнений. Например, при добавлении в шкалу Каприни, которая используется для стратификации тромботического риска в хирургии, параметров тромбодинамики, превышающих нормальные диапазоны, предиктивная способность шкалы в отношении тромбозов достоверно увеличивалась [39].

В целях профилактики и терапии тромботических осложнений применяются антикоагулянтные препараты. В настоящее время наиболее распространенными являются гепарины (нефракционированный гепарин и препараты низкомолекулярных гепаринов), а также прямые оральные антикоагулянты (ривароксабан, дабигатран, апиксабан). Надежных инструментов для

оценки эффективности и безопасности терапии антикоагулянтами не существует, а существующие методы основаны на оценке концентрации препарата безотносительно оценки состояния собственно системы свертывания либо обладают сомнительной чувствительностью. Для оценки пригодности тромбодинамики для мониторинга гепаринов были проведены как *in vitro* [50], так и *in vivo* [45] сравнения с уже существующими тестами и методиками, такими как АЧТВ, тест генерации тромбина, тромбоэластография, измерение анти-Ха-активности в плазме крови. Тромбодинамика оказалась более чувствительна к гепарину, чем АЧТВ, чувствительность тромбодинамики была сравнима с чувствительностью анализа анти-Ха и сопоставима или выше, чем у теста генерации тромбина и тромбоэластографии [45]. Помимо этого, тромбодинамика продемонстрировала хорошую дозозависимость от концентрации гепарина. Была определена функция, связывающая значение скорости роста сгустка в тромбодинамике и концентрации гепарина в плазме. Это позволяет точно рассчитать правильную дозу препарата, необходимую для достижения эффективной антикоагуляции у отдельного пациента [50]. На основе проведенных исследований были созданы методические рекомендации по индивидуальному подбору дозировок гепарина на основе данных тромбодинамики [51].

Дальнейшее развитие и усовершенствование тромбодинамики как клинического метода привело к интеграции экспериментальных наработок по регистрации автоволны тромбина в уже существующий прибор. Новая методика позволила приблизиться к решению ранее недостижимых задач, таких как интегральная оценка влияния тромбоцитарных патологий на свертывание и контроль терапии прямыми оральными антикоагулянтами [41]. На данный момент эта область находится в стадии активного развития по части клинических исследований.

ГЕМОСТАЗ И ГЕМОДИЛЮЦИЯ

Тесное взаимодействие научной группы с клиницистами Гематологического научного центра также привело к развитию в команде нового направления, связанного с изучением влияния гемодилюции на состояние свертывающей системы крови.

Коррекция ряда патологических состояний требует восполнения объемной кровопотери, для чего в качестве растворов первой линии используют инфузию искусственных плазмозамещающих растворов (ПЗР). Такая инфузия необходима при массивной кровопотере в условиях обширной травмы или при хирургических операциях, ожогах, сепсисе, в акушерстве и так далее [52]. Основной задачей инфузии ПЗР является вос-

полнение объема циркулирующей крови (для поддержания артериального давления, нормального коллоидно-осмотического давления плазмы и ее кислотно-щелочного равновесия, объема сердечного выброса, предупреждения коллапса сосудов, сохранения нормальных реологических характеристик крови и нормальной перфузии органов и тканей) [3].

Частыми осложнениями объемных инфузий ПЗР являются нарушения гемостаза. Поскольку современные ПЗР не содержат компонентов системы свертывания крови, их инфузия в больших объемах вызывает разбавление всех компонентов этой системы. Этот процесс называют гемодилюцией, и он, безусловно, сдвигает различные равновесия в системе свертывания, нарушая баланс про- и антикоагулянтных реакций, что не может не влиять на гемостаз. Как ни странно, общепринятого мнения о том, насколько переливание ПЗР влияет на систему свертывания, долгое время не существовало. Что еще более удивительно, сам вопрос о том, в какую сторону направлено это влияние, также не имел однозначного ответа.

Гемостаз при разбавлении крови (плазмы) различными ПЗР был изучен во многих работах как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако полученные данные были очень противоречивы. Это связано с тем, что существует большое количество различных факторов, которые могут влиять на гемостаз при гемодилюции в противоположных направлениях, в том числе тип и объем перелитого раствора, а также другие факторы, которые могут сопутствовать травме или определенному состоянию пациента, но не связаны прямо с процессом гемодилюции (например, возникновение обширной раневой поверхности, гипотермия, наличие воспаления, сниженные функции тромбоцитов и др.) [53–56]. В своей работе мы задались целью исследовать, как на плазменное звено свертывания влияет сам процесс разбавления крови/плазмы при сохранении всех других условий постоянными. Для этого мы систематически изучили изменения гемостаза при различных степенях разбавления плазмы разными ПЗР *in vitro* (в условиях постоянного рН и концентрации ионов Ca^{2+} в системе) [57].

Так как в клинике после массивных инфузий ПЗР часто наблюдаются микрососудистые и другие кровотечения, большинство клиницистов интуитивно полагает, что разбавление плазмы должно приводить к замедлению свертывания из-за снижения концентраций прокоагулянтных факторов (коагулопатии разбавления) [55, 58]. Это подтверждалось результатами экспериментов, в которых измеряли стандартные показатели свертывания – активированное частичное тромбопластиновое время и протромбиновое время, которые при разбавлении плазмы всегда удлиня-

лись [58, 59]. Однако такая пролонгация наблюдается, только если концентрация прокоагулянтных факторов в плазме снижается на 50–80%, что позволяет предполагать, что данные факторы присутствуют в плазме в большом избытке [59–61]. Ситуация с антикоагулянтами (прежде всего антитромбином III) другая. Их реакции с активными факторами-мишенями подчиняются кинетике второго порядка, что означает, что скорость ингибирования снижается прямо пропорционально уменьшению концентрации ингибитора [62]. Таким образом, мы предположили, что ответом гемостаза на гемодилюцию до разбавления приблизительно в 2.0–2.5 раза может быть ускорение свертывания, так как в этой области разбавлений свертывание еще не подавлено из-за снижения концентраций прокоагулянтных факторов, но оно уже ускорено из-за снижения в концентрациях антикоагулянтов. Это подтверждается работами *in vitro* [63–65] и рядом клинических наблюдений [66–69], которые прямо указывали на вероятность тромботических осложнений при увеличении разбавления плазмы и объемов перелитого ПЗР. Так как система гемостаза представляет собой тонко сбалансированный механизм с десятками участников, среди которых на полных правах присутствуют как прокоагулянтные факторы (протромбин, фибриноген и другие), так и антикоагулянты (антитромбин, протеин С, ингибитор пути тканевого фактора и т.д.), предсказать результат одновременного разбавления всех этих факторов из общих соображений без модельных расчетов невозможно. Баланс при разбавлении в таких системах может смещаться как в одну, так и в другую сторону.

Наши эксперименты по измерению АЧТВ и протромбинового времени при разбавлении плазмы различными ПЗР полностью подтвердили ранее полученные результаты. Это косвенно подтверждает популярную гипотезу о том, что гемодилюция ухудшает свертывание, снижая концентрации прокоагулянтных факторов. Тем не менее, данный факт не может служить прямым доказательством этой гипотезы, так как хорошо известно, что стандартные клоттинговые тесты очень малочувствительны к гиперкоагуляционным состояниям плазмы [70]. Это связано с самой природой тестов протромбинового времени и АЧТВ, которые проводят в условиях максимальной активации свертывания в образце (в присутствии избытка добавленных фосфолипидов, а также избытка активатора свертывания). Кроме того, плазма при проведении этих тестов разбавляется в три раза, поэтому любое дополнительное разбавление образца снизить концентрации всех компонентов системы свертывания еще больше, в область, где скорость коагуляции уже зависит от концентрации прокоагулянтных факторов. Таким образом, стало понятно, что для то-

го, чтобы определить реальное состояние гемостаза в плазме при гемодилюции, надо использовать другие методы, которые являются чувствительными как к гипо-, так и к гиперкоагуляции. Именно поэтому, ранее большое количество работ по изучению гемостаза при гемодилюции было проведено с помощью метода тромбоэластографии [64, 68, 71–73]. Однако разбавление плазмы влияет на различные параметры тромбоэластограммы в противоположных направлениях: оно часто приводит к укорочению измеряемых времен реакции (r) и коагуляции (k), что говорит об ускорении свертывания, но уменьшает максимальную силу сгустка (МА или G), которая зависит от концентрации фибриногена и тромбоцитов в исследуемой плазме, и уменьшение которой принято считать ослаблением свертывания. Таким образом, данные полученные с помощью тромбоэластографии, демонстрируют сложную картину, не позволяющую однозначно судить об изменении баланса системы в сторону гипо- или гиперкоагуляции.

В нашей работе были использованы два других метода интегральной оценки коагуляционного статуса: тест генерации тромбина [74] и измерение скорости роста сгустка в пространстве (тест тромбодинамики) [50]. Оба эти метода используют гораздо более низкую активацию свертывания, чем стандартные клоттинговые тесты. Как было показано, оба они высокочувствительны как к гипо-, так и к гиперкоагуляционным нарушениям свертывания [70, 75]. Кроме того, была прямо измерена скорость полимеризации фибрина в исходной плазме и той же плазме, разбавленной различными ПЗР в два раза (\pm фактор XIII).

Необходимо отметить, что широко распространенный тест генерации тромбина предполагает разбавление плазмы в ходе измерения в полтора раза. Это не позволяет провести измерения в неразбавленной плазме и в плазме, разбавленной менее, чем в полтора раза, поэтому сначала был разработан метод измерения генерации тромбина без дополнительного исходного разбавления, в котором разбавление образца при измерении составляло 1.025 раза [76]. Проведенные эксперименты показали, что при разбавлении плазмы любым ПЗР до 2.0–2.5 раз количество активного тромбина, генерируемого в образце при стандартной активации свертывания (эндогенный тромбиновый потенциал), возрастает. Одновременно увеличивалась максимальная концентрация тромбина, наблюдаемая в образце (A_{\max}) и сокращалось время достижения этой максимальной концентрации (t_{\max}). Все это свидетельствовало об усилении свертывания (гиперкоагуляции). При более высоких степенях разбавления генерация тромбина начинала снижаться, что, по-види-

тому, было связано уже с сильным разбавлением предшественников прокоагулянтных факторов.

Существование гиперкоагуляции при умеренных степенях разбавления плазмы было также показано нами *in vitro* и *in vivo* (у доноров костного мозга, получающих инфузии физиологического раствора или гидроксипропилкрахмала (НЕС 130/0.4)) по увеличению скорости роста сгустка в плазме методом тромбодинамики [76–78]. При этом эффект достаточно сильно зависел как от пути активации свертывания (внешнего или внутреннего), так и от типа использованного ПЗР. При увеличении разбавления до двух-трех раз скорость роста сгустка возрастала для различных ПЗР на 25–75% относительно неразбавленной плазмы. Эффект был более выражен при контактном пути активации и использовании коллоидных ПЗР. Это позволяет предположить, что коллоиды могут иметь на образование сгустка двойной эффект. С одной стороны, они при умеренных степенях гемодилюции ускоряют свертывание, как и все остальные ПЗР, а с другой — они могут препятствовать образованию сгустка за счет влияния на отдельные факторы свертывания (например, путем снижения концентраций факторов VIII и фон Виллебранда). При этом сгустки образуются быстро, но могут иметь сниженную прочность.

Для доказательства этого предположения были прямо измерены скорости полимеризации фибрина в растворе фибриногена (4 мг/мл) и том же растворе, разбавленном в два раза различными ПЗР. В результате было показано, что скорость полимеризации не изменяется статистически значимо в присутствии кристаллоидов, но увеличивается (в 1.3–1.8 раза) в присутствии большинства коллоидов (\pm фактор XIII) [79, 80]. Это опровергает ранее существовавшую гипотезу, о том, что коллоидные растворы замедляют скорость полимеризации фибрина, ухудшая тромбин-фибриногеновые взаимодействия и/или взаимодействия фактора XIIIa с фибрин-полимером [81]. Эта гипотеза была основана на данных тромбозаграфии, которая, однако, измеряет не скорость полимеризации, а вязко-эластичные свойства сгустка. Наши предварительные электронно-микроскопические данные показали, что общий вид сгустков и волокон фибрина в них различаются в присутствии разных ПЗР. Так, в цельной крови или крови, разбавленной раствором альбумина (1:1), диаметр волокон составлял примерно 300–450 нм, тогда как при разбавлении раствором гелофузина (1:1) он был снижен (220–300 нм), а сам сгусток состоял из отдельных, не связанных друг с другом кластеров фибрина. В присутствии декстрана 40 кДа (реополиглобулина), наоборот, образовывались длинные и толстые (диаметр волокон 970–1440 нм) параллельно упакованные волокна. Это подтверждает наше пред-

положение о влиянии искусственных коллоидных ПЗР на качество сгустков [79].

Изучение природы гемодилюционной гиперкоагуляции позволило разработать новый ПЗР, позволяющий частично компенсировать эту гиперкоагуляцию. Для этого в стандартный физиологический раствор был добавлен ингибитор тромбина (антитромбин III или искусственный синтетический ингибитор HC-019s-IOС). Эффективность такой стратегии мы подтвердили опытами *in vitro* [76], а также в модели гемодилюционной гиперкоагуляции у крыс *in vivo* [77].

ВЛИЯНИЕ ПОТОКА НА СВЕРТЫВАНИЕ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Создание детальных моделей системы свертывания крови, которые позволяли описывать динамику пространственного распространения фибринового сгустка в тонком слое непрерываемой плазмы, помогло исследовать механизмы регуляции, связанные с диффузионным транспортом веществ. Логическим продолжением этих исследований стала серия экспериментальных и теоретических работ по влиянию потока плазмы крови на образование и рост фибринового сгустка. Первые экспериментальные работы, начатые в 2003 г., использовали проточные камеры с характерным размером рабочей области от одного до нескольких десятков миллиметров, что приводило к колоссальным расходам плазмы крови на один эксперимент (до нескольких сотен мл) и ограничивало использование ингибиторов контактной активации. Из-за этого и особой геометрии камеры рост сгустка начинался в застойных областях канала, затрудняя определение вклада потока. Эта серия экспериментов не получила позитивного завершения, и следующая серия стартовала только в 2010-х годах. В новой серии экспериментов свертывание крови наблюдалось в стеклянных капиллярах диаметром 0.5–0.8 мм, с протравленной кислотой областью, в которой размещался активатор свертывания. Сложность геометрии и реконструкции получаемого сгустка, а также невысокая воспроизводимость получения областей активации не позволили интерпретировать полученные результаты. Настоящий прорыв в экспериментальных исследованиях влияния потока на свертывание крови случился в только после 2015 г., когда появились и стали доступны новые технологии изготовления проточных камер малого размера и способы регистрации и обработки сигнала [82, 83].

В отличие от экспериментальных работ, теоретические исследования в данной области были более успешны. Так, в работе 2010 г. [28] мы показали, что скорость тока крови может регулировать начало свертывания пороговым образом: до определенных величин сдвиговой скорости пото-

ка время начала тромбообразования очень слабо увеличивается по мере увеличения скорости, а при превышении этой величины нарастает очень быстро, что, по сути, означает выключение свертывания. Ряд параметров модели тромбообразования влияет на величину этого порога: увеличение концентрации фибрин-мономеров, при которой происходит полимеризация и образование сетки, резистентной к потоку, приводит к ее уменьшению, а увеличение размера области активации — к увеличению. Сам эффект достигается за счет комбинации положительной обратной связи активации фактора VII, связанного с тканевым фактором, активированным фактором Ха и эффективного удаления фактора Ха потоком из области активации, лишаящего обратную связь способности инициировать свертывание. Уровень этого триггера (то есть чувствительность коагуляции к потоку) контролируется активностью ингибитора пути тканевого фактора.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИБРИНОЛИЗА

Первые исследования фибринолиза в команде Ф.И. Атауллаханова начались с теоретических работ в 2005 г., но результаты были получены и оформлены только к 2017 г. В работе [84], включающей в себя эксперименты *in vitro* и моделирование *in silico*, нами было показано, что в системе с высоким содержанием тканевого активатора плазминогена (ТПА), урокиназного активатора плазминогена или стрептокиназы за фронтом фибринового сгустка, распространяющегося в пространстве от тканевого фактора, следует фронт растворения сгустка, распространяющийся из той же исходной точки. Скорость распространения фронта лизиса линейно зависела от скорости распространения фронта свертывания (коэффициент корреляции $r^2 = 0.91$). ТПА в высоких концентрациях начинала увеличивать время начала лизиса и снижать скорость распространения лизиса, предположительно из-за истощения запасов плазминогена.

В работе 2020 г. мы исследовали механизмы регуляции тромболизиса, лизиса фибринового сгустка, индуцированного фармакологически [85]. Для этого была разработана реакционно-диффузионно-адвективная модель тромболизиса под воздействием ТПА в окклюзированном сосуде с градиентом давления. Распространение тромболизиса в системе без потока контролировалось преимущественно диффузией ТПА, в то время как транспорт других активных компонентов был несущественным либо из-за их высоких параметров связывания фибрина и короткого времени жизни, либо из-за их исходного равномерного распределения. Через концентрацию основного ингибитора ТПА — ингибитора активатора плазминогена 1 (РАI-1) — контролировалась

как степень распространения лизиса, так и форма пространственного распределения фибрина во время лизиса. Интересно, что РАI-1 оставался важным даже тогда, когда его концентрация была на порядок ниже концентрации ТПА, из-за его роли на краю диффундирующего фронта ТПА. При наличии потока конвекция ТПА была критическим процессом, управляющим лизисом; хотя роль концентрации РАI-1 была намного меньше при наличии кровотока, ее влияние возрастало при наличии коллатеральных шунтирующих сосудов, которые значительно снижали поток ТПА через тромб. Это повышало отношение РАI-1/ТПА, тем самым делая ингибирование, вызванное РАI-1, актуальным для регуляции пространственного лизиса вплоть до его остановки.

МЕМБРАННО-ЗАВИСИМЫЕ РЕАКЦИИ НА ПОВЕРХНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ

Ключевые реакции каскада свертывания происходят на богатых отрицательно заряженными фосфолипидами мембранах, что, по всей видимости, позволяет не только локализовать данные реакции в пространстве, но и защитить их от действия потока. Долгое время считалось, что основными клетками, предоставляющими такие мембраны при гемостазе, являются активированные тромбоциты. Исследование механизмов протекающей мембранно-зависимых реакций крови в нашей команде началось в начале 2000-х годов в рамках разработки детальной математической модели свертывания крови [21]. Первоначально вся экспериментальная работа была направлена на валидацию разрабатываемых компьютерных моделей [22]. Однако в это же время в мире заговорили о гетерогенности активированных тромбоцитов и о ведущей роли только одной субпопуляции фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов — так называемых прокоагулянтных тромбоцитов — в связывании факторов свертывания [86]. В связи с этим потребовался пересмотр имеющихся данных об участии тромбоцитов в мембранных реакциях. В рамках данного направления было охарактеризовано связывание факторов свертывания, входящих в комплекс внутренней теназы, с обеими субпопуляциями активированных тромбоцитов. Было показано, что только прокоагулянтные тромбоциты связывают факторы свертывания и как следствие могут участвовать в мембранных реакциях свертывания крови [87].

Затем последовал значительный перерыв в исследовании мембранно-зависимых реакций, а все основные работы были сосредоточены на исследовании механизмов разделения тромбоцитов на субпопуляции [88, 89]. Только спустя почти 10 лет тема мембранных реакций была поднята снова. В частности, продолжилась разработка математи-

ческих моделей [90], а также экспериментальные работы в данном направлении [91, 92].

Так, была обнаружена гомо- и гетеро- мультимеризация ключевого фермента свертывания фактора Ха [91], которая приводит к его удержанию на мембране в присутствии потока крови. Совершенно новым и неожиданным оказался тот факт, что факторы и реакции свертывания оказываются неравномерно распределены на поверхности тромбоцитов, будучи локализованы в небольшой области мембраны [92, 93]. Такое распределение факторов свертывания может приводить к ускорению реакции на порядки и обеспечивать дополнительную защиту от вымывания потоком (за счет сложной ультраструктуры этого региона).

Кроме того, работы данного периода рассматривают не только особенности сборки и функционирования основных ферментативных комплексов свертывания на мембранах тромбоцитов, но также и глобально особенности взаимодействия плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза. В частности, роль тромбоцитов в активации контактного пути через фактор XII [94], а также механизмы взаимодействия фактора XIII с субпопуляциями тромбоцитов [91]. Следует отметить, что в области исследования мембранно-зависимых реакций исторически сложилась тесная взаимосвязь между математическими моделями и экспериментами, взаимно дополняющими друг друга.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПУТЕЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

Первые шаги нашего коллектива по исследованию внутриклеточной сигнализации были связаны с попытками экспериментально выяснить, как управляется формирование прокоагулянтных тромбоцитов [89, 95]. Тем не менее, только использование биофизических подходов и математического моделирования позволило предложить механизм, связанный с интегрированием кальциевых сигналов и коллапсом митохондрий [88], позднее подтвержденный экспериментально [96]. Это дало начало большому направлению исследования внутриклеточной сигнализации клеток, которое вышло за пределы прокоагулянтных тромбоцитов и сейчас фокусируется на разных аспектах метаболизма, сигнализации, разработки клинических методов и выявления патофизиологических механизмов заболеваний [97–103].

ИЗУЧЕНИЕ ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ В ПОТОКЕ КРОВИ

Появление в команде новых направлений, связанных с исследованием тромбоцитов и их ро-

ли в свертывании крови, привело к необходимости создания новых экспериментальных и теоретических моделей формирования тромба в условиях потока. Первые экспериментальные исследования в этом направлении были неразрывно связаны с изучением механических особенностей взаимодействия различных субпопуляций активированных тромбоцитов, а также структурных особенностей прокоагулянтных тромбоцитов.

Простейшие проточные камеры изначально применялись для анализа особенностей распределения различных флуоресцентных маркеров в тромбоцитарных агрегатах при помощи конфокальной микроскопии: было показано, что включение прокоагулянтных тромбоцитов в тромбоцитарные агрегаты происходит благодаря наличию у них особой структуры – так называемой «шапки», в которой концентрируются различные альфа-гранулярные белки [93]. Ранее было также показано, что прокоагулянтные тромбоциты могут включаться в агрегаты, состоящие преимущественно из обычных проагрегаторных тромбоцитов, но при этом друг с другом прокоагулянтные тромбоциты практически не взаимодействуют [104].

Прокоагулянтные тромбоциты образуются при достаточно сильных активационных стимулах, однако в большинстве *in vitro* моделей тромбообразования обнаруживаются на поверхности тромбов. Благодаря развитию новых *in vitro* моделей тромбообразования в потоке, а также в сотрудничестве с лабораторией П. Монжана (Университет Страсбурга, Франция) нашей командой было показано, что прокоагулянтные тромбоциты вытесняются на поверхность тромбоцитарных агрегатов в результате процесса контракции: из-за их слабого взаимодействия с остальными тромбоцитами, они механически выдавливаются из сжимающейся центральной части растущего агрегата [82]. Данный феномен также может объяснять обогащение фибрином поверхности тромбов, формирующихся *in vitro* в условиях потока, которое также наблюдается и в гемостатических тромбах *in vivo*, – наряду с поверхностным распределением прокоагулянтных тромбоцитов. Возможно, перераспределение прокоагулянтных тромбоцитов на границу сильно активированного «ядра» сгустка может также способствовать механической дестабилизации внешней части артериального тромба и приводить к ее отслоению от внутренней части сгустка – явлению, наблюдаемому во многих *in vivo* моделях артериального тромбоза.

Разработанные в нашей команде микрофлюидные проточные камеры сегодня используются не только для фундаментальных исследований [82, 83], но и в качестве нового интегрального теста гемостаза: в настоящее время на базе НИИЦ ДГОИ имени Д. Рогачева идут исследования по

апробации и внедрению в клиническую практику диагностического теста, позволяющего оценивать параметры тромбообразования в условиях потока цельной крови.

Для исследования возможных механизмов остановки роста богатого тромбоцитами артериального тромба в команде также активно развивались компьютерные модели тромбообразования [105]. В сотрудничестве с французской командой В. Вольперта была создана модель, основанная на формализме частиц, позволившая исследовать механизм остановки, связанный с образованием богатой фибрином «шапки» тромба, которая обнажается после отрыва внешней части агрегата [106]. В соответствии с данной гипотезой дальнейший рост тромба останавливается из-за низкой адгезионной способности неактивированных тромбоцитов к фибрину. Другой предложенный механизм остановки роста тромба (и переключения в окклюзивный режим) основан на поведении внешней границы растущего тромба и зависимости баланса между прикреплением и откреплением тромбоцитов от локальной скорости сдвига [107]. При помощи данной модели было показано, что переключение в окклюзивный режим может происходить при увеличении длины повреждения: рост гидравлического сопротивления участка сосуда при формировании более длинного агрегата уменьшает критическую скорость сдвига на поверхности растущего тромба (из-за падения общего потока крови) — что приводит к окклюзии. Благодаря развитию *in vivo* моделей тромбоза в артериолах мыши было показано, что внешняя часть тромба — так называемая оболочка — демонстрирует сложную динамику, напоминающую движение вязко-упругой массы [108]. Для исследования физических механизмов данного явления в команде была разработана новая модель роста тромба, учитывающая как стохастические первичные взаимодействия клеток, так и взаимодействия по классическому детерминистическому механизму (описываемому потенциалом Морзе). При помощи данной модели было показано, что «текучесть» внешней части тромба может быть связана именно со стохастическим характером первичных контактов между клетками — в которые, по всей видимости, вовлечено небольшое количество лиганд-рецепторных комплексов [109, 110]. Предложенная модель затем была существенно расширена с целью явного описания ключевых тромбоцитарных агонистов — тромбина и АДФ — и использована для изучения физических механизмов гетерогенной структуры артериального тромба [111]. Следует отметить, что ни одна из предложенных моделей не позволяет описать наблюдаемую в *in vivo* экспериментах динамику неокклюзивного тромба: затухающие циклы роста и срыва отдельных внешних частей тромба, чаще наблюдаемые в артериях мыши, либо бурный рост и плавное уменьшение размеров агрегата, наблюдаемое в микрососудах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свертывание крови представляет собой яркий пример ситуации, когда биофизический подход к исследованию сложной, пространственно-неоднородной и нестационарной системы позволил радикально пересмотреть представления о том, как она работает и зачем нужны те или иные ее части, а также предложить новые методы диагностики. При этом работа биофизиков началась по сути только после того, как само по себе устройство системы было более или менее определено: последние принципиальные белки и реакции в свертывании крови были открыты в 1989–1991 гг.

Открытие автоволнового характера распространения активности тромбина в пространстве, наблюдаемое в определенных условиях, позволило предложить новый чувствительный способ оценки состояния плазменного звена гемостаза, который в настоящее время активно внедряется в клиническую практику. Следует, однако, отдать должное сложности системы гемостаза: несмотря на десятилетия исследований, мы по-прежнему далеки от понимания ключевых вопросов:

Каковы механизмы самоорганизации гемостатического ответа?

Как происходит остановка роста сгустка?

Возможно ли корректировать состояние гемостаза в случае его нарушения с минимальными рисками тромботических осложнений или кровотечений?

Хочется надеяться, что будущие поколения исследователей смогут найти ответы на эти и многие другие важные вопросы.

На сегодняшний день наш коллектив насчитывает несколько десятков ученых и молодых исследователей — студентов, аспирантов, сотрудников и выпускников МГУ имени М.В. Ломоносова, МФТИ и многих других ВУЗов Москвы, которые составляют основную часть Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН и работают не только на базе данного Института, но и в МГУ, НМИЦ ДГОИ имени Рогачева и других научных центрах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (гранты № 22-24-01028 (разделы «Введение», «Феноменологические модели свертывания крови», «Изучение тромбообразования в потоке крови» и «Заключение») и № 21-45-00012 (остальные разделы статьи)).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ф. И. Атауллаханов, В. И. Зарницына, А. Ю. Кондратович и др., *Успехи физ. наук*, **172** (6), 671 (2002).
2. M. C. Cross and P. C. Hohenberg, *Rev. Mod. Phys.*, **65**, 851 (1993).
3. О. А. Морнев, А. В. Панфилов и Р. Р. Алиев, *Биофизика*, **37** (1), 123 (1992).
4. F. I. Ataullakhanov, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1425**, 453 (1998).
5. Ф. И. Атауллаханов и Г. Т. Гурия, *Биофизика*, **39** (1), 89 (1994).
6. Ф. И. Атауллаханов, Г. Т. Гурия и А. Ю. Сафрошкина, *Биофизика*, **39**, 99 (1994).
7. V. I. Zarnitsina, A. V. Pokhilko, and F. I. Ataullakhanov, *Thromb. Res.*, **84**, 225 (1996).
8. V. I. Zarnitsina, A. V. Pokhilko, and F. I. Ataullakhanov, *Thromb. Res.*, **84**, 333 (1996).
9. V. I. Zarnitsina, et al., *Chaos*, **11**, 57 (2001).
10. C. P. Schenk, et al., *Phys. Rev. E*, **57**, 6480 (1998).
11. Т. К. Старожилова, А. И. Лобанов и Г. Т. Гурия, *Мат. моделир.*, **9** (2), 21 (1997).
12. А. И. Лобанов, Т. К. Старожилова и Г. Т. Гурия, *Мат. моделир.*, **9** (8), 83 (1997).
13. Г. Т. Гурия, А. И. Лобанов и Т. К. Старожилова, *Биофизика*, **43**, 526 (1998).
14. А. И. Лобанов и Т. К. Старожилова, *Мат. моделир.*, **9** (12), 3 (1997).
15. F. I. Ataullakhanov, D. A. Molchanova, and A. V. Pokhilko, *Biofizika*, **40** (2), 434 (1995).
16. V. I. Zarnitsina, A. V. Pokhilko, and F. I. Ataullakhanov, *Thromb. Res.*, **84** (4), 225 (1996).
17. V. I. Zarnitsina, A. V. Pokhilko, and F. I. Ataullakhanov, *Thromb. Res.*, **84** (5), 333 (1996).
18. V. I. Zarnitsina, F. I. Ataullakhanov, A. I. Lobanov, and O. L. Morozova, *Chaos*, **11** (1), 57 (2001).
19. M. V. Ovanesov, J. V. Krasotkina, L. I. Ul'yanova, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1572** (1), 45 (2002).
20. M. A. Pantelev, V. I. Zarnitsina, and F. I. Ataullakhanov, *Eur. J. Biochem.*, **269** (8), 2016 (2002).
21. M. A. Pantelev, E. L. Saenko, N. M. Ananyeva, and F. I. Ataullakhanov, *Biochem. J.*, **381** (3), 779 (2004).
22. M. A. Pantelev, N. M. Ananyeva, N. J. Greco, et al., *FEBS J.*, **273** (2), 374 (2006).
23. M. A. Pantelev, M. V. Ovanesov, D. A. Kireev, et al., *Biophys. J.*, **90** (5), 1489 (2006).
24. F. I. Ataullakhanov and M. A. Pantelev, *Pathophysiol Haemost Thromb.* **34** (2-3), 60 (2005).
25. M. A. Pantelev, N. M. Ananyeva, F. I. Ataullakhanov, and E. L. Saenko, *Curr. Pharm. Des.*, **13** (14), 1457 (2007).
26. M. A. Pantelev, A. N. Balandina, E. N. Lipets, et al., *Biophys. J.*, **98** (9), 1751 (2010).
27. A. N. Balandina, A. M. Shibeko, D. A. Kireev, et al., *Biophys. J.*, **101** (8), 1816 (2011).
28. A. M. Shibeko, E. S. Lobanova, M. A. Pantelev, and F. I. Ataullakhanov, *BMC Syst. Biol.*, **4**, 5 (2010).
29. O. A. Fadeeva, M. A. Pantelev, S. S. Karamzin, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **75** (6), 734 (2010).
30. L. A. Parunov, O. A. Fadeeva, A. N. Balandina, et al., *J. Thromb. Haemost.*, **9** (9), 1825 (2011).
31. N. M. Dashkevich, M. V. Ovanesov, A. N. Balandina, et al., *Biophys. J.*, **103** (10), 2233 (2012).
32. A. D. Kuprash, A. M. Shibeko, R. Vijay, et al., *Biophys. J.*, **115** (12), 2461 (2018).
33. F. I. Ataullakhanov, R. I. Volkova, G. T. Guria, and V. I. Sarbash, *Biofizika*, **40** (6), 1320 (1995).
34. M. V. Ovanesov, N. M. Ananyeva, M. A. Pantelev, et al., *J. Thromb. Haemost.*, **3** (2), 321 (2005).
35. M. V. Ovanesov, M. A. Pantelev, E. I. Sinauridze, et al., *Blood Coagul. Fibrinolysis*, **19** (8), 743 (2008).
36. O. A. Fadeeva, M. A. Pantelev, S. S. Karamzin, et al., *Biochemistry*, **75** (6), 734 (2010).
37. N. P. Soshitova, S. S. Karamzin, A. N. Balandina, et al., *Blood Coagul. Fibrinolysis*, **23** (6), 498 (2012).
38. E. Lipets, O. Vlasova, E. Urnova, et al., *PLoS One*, **9** (1), e87692 (2014).
39. K. Lobastov, G. Dementieva, N. Soshitova, et al., *J. Vasc. Surg. Venous Lymphat. Disord.*, **8** (1), 31 (2020).
40. E. M. Koltsova, A. N. Balandina, K. I. Grischuk, et al., *J. Perinat. Med.*, **46** (3), 251 (2018).
41. E. M. Koltsova, M. A. Sorokina, A. S. Pisaryuk, et al., *PLoS One*, **16** (12), 1 (2021).
42. E. Voroshilina, R. Ovsepyan, E. Plotko, et al., *Bull. RSMU*, **40** (2015).
43. A. N. Balandina, E. M. Koltsova, T. A. Teterina, et al., *PLoS One*, **14** (5), e0216724 (2019).
44. M. A. Gracheva, E. S. Urnova, E. I. Sinauridze, et al., *Leuk. Lymphoma*, **56** (12), 3418 (2015).
45. A. N. Balandina, I. I. Serebriyskiy, A. V. Poletaev, et al., *PLoS One*, **13** (6), e0199900 (2018).
46. E. A. Seregina, A. V. Poletaev, E. V. Bondar, et al., *Thromb. Res.*, **176**, 11 (2019).
47. E. A. Seregina, N. V. Tsvetaeva, O. F. Nikulina, et al., *Blood Cells Mol. Dis.*, **54** (2), 144 (2015).
48. E. A. Seregina, O. F. Nikulina, N. V. Tsvetaeva, et al., *Int. J. Hematol.*, **99** (5), 588 (2014).
49. E. M. Koltsova, E. N. Balashova, A. A. Ignatova, et al., *Pediatr. Res.*, **85** (1), 63 (2019).
50. E. I. Sinauridze, T. A. Vuimo, I. D. Tarandovskiy, et al., *Talanta*, **180**, 282 (2018).
51. Ф. И. Атауллаханов, А. Н. Баландина, Д. М. Варданян и др., *Применение теста тромбодинамики для*

- оценки состояния системы гемостаза. Учебно-методические рекомендации (2015).
52. A. Maniatis, P. Van der Linden, and J. F. Hardy, In *Alternatives to Blood Transfusion in Transfusion Medicine*, 2nd ed. (Blackwell Publ. Ltd, Oxford, UK, 2011), part 3, pp. 83–202.
 53. G. R. Phillips, D. R. Kauder, and C. W. Schwab, *Postgrad. Med.*, **95** (4), 61 (1994).
 54. L. A. Lapointe and K. T. Von Rueden, *AACN Clin. Issues*, **13** (2), 192 (2002).
 55. J. F. Hardy, P. De Moerloose, and M. Samama, *Can. J. Anaesth.*, **51** (4), 293 (2004).
 56. B. Sorensen and D. Fries, *Br. J. Surg.*, **99** (Suppl. 1), 40 (2012).
 57. E. I. Sinauridze, A. S. Gorbatenko, E. A. Seregina, et al., *Sci. Rep.*, **7** (1), 1 (2017).
 58. J. R. Hewson, P. B. Neame, N. Kumar, et al., *Crit. Care Med.*, **13** (5), 387 (1985).
 59. D. Ciavarella, R. L. Reed, R. B. Counts, et al., *Br. J. Haemost.*, **67** (3), 365 (1987).
 60. R. B. Counts, C. Haisch, T. L. Simon, et al., *Ann. Surg.*, **190** (1), 91 (1979).
 61. G. A. Allen, A. S. Wolberg, J. A. Oliver, et al., *J. Thromb. Haemost.*, **2** (3), 402 (2004).
 62. J. Jesty, *Blood*, **66**, 1189 (1985).
 63. K. Ekseth, L. Abildgaard, M. Vegfors, et al., *Anaesthesia*, **57** (11), 1102 (2002).
 64. T. G. Ruttman, M. F. James, and J. F. Viljoen, *Br. J. Anaesth.*, **76** (3), 412 (1996).
 65. E. De Smedt, R. and C. Hemker, *Thromb. Haemost.*, **101** (01), 165 (2009).
 66. T. G. Ruttman, M. F. Jame, and I. Aronson, *Br. J. Anaesth.*, **80** (5), 612 (1998).
 67. S. B. Janvrin, G. Davies, and R. M. Greenhalgh, *Br. J. Surg.*, **67** (10), 690 (1980).
 68. K. J. Tuman, B. D. Spiess, R. J. McCarthy, and A. D. Ivankovich, *Anesth. Analg.*, **66** (9), 856 (1987).
 69. K. F. J. Ng, C. C. K. Lam, and L. C. Chan, *Br. J. Anaesth.*, **88** (4), 475 (2002).
 70. H. C. Hemker and S. Beguin, *Thromb. Haemost.*, **84** (11), 747 (2000).
 71. T. G. Ruttman, *Br. J. Anaesth.*, **88** (4), 470 (2002).
 72. V. G. Nielsen and M. S. Baird, *Anesth. Analg.*, **90** (3), 541 (2000).
 73. V. G. Nielsen, *Blood Coagul. Fibrinolysis*, **15** (1), 55 (2004).
 74. H. C. Hemker, P. Giesen, R. Al Dieri, et al., *Haemost. Thromb.*, **33** (1), 4 (2003).
 75. I. V. Gribkova, E. N. Lipets, I. G. Rekhina, et al., *Sci. Rep.*, **6**, 29242 (2016).
 76. Е. И. Синауридзе, А. С. Горбатенко, И. В. Грибкова и др., *Технологии живых систем*, **5** (1), 3 (2008).
 77. Е. И. Синауридзе, С. С. Суров, И. В. Грибкова и др., *Технологии живых систем*, **6** (8), 67 (2009).
 78. Е. И. Синауридзе, А. Ю. Буланов, О. В. Щербакова и др., *Терапевтич. архив*, **81** (1), 52 (2009).
 79. Е. И. Синауридзе, И. В. Грибкова и С. И. Обыденный, *Гематол. и трансфузиол.*, **59** (S1), 26 (2014).
 80. E. I. Sinauridze and I. V. Gribkova, *J. Thromb. Haemost.*, **9** (Suppl. 2), 506 (2011).
 81. V. G. Nielsen, *Acta Anesthesiol. Scand.*, **49** (8), 1163 (2005).
 82. D. Y. Nechipurenko, N. Receveur, A. O. Yakimenko, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **39** (1), 37 (2019).
 83. A. D. Megalinskiy, V. M. Loginova, A. M. Shibeko, et al., *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A*, **16** (1), 38 (2022).
 84. A. S. Zhalyalov, M. A. Pantelev, M. A. Gracheva, et al., *PLoS One*, **12** (7), e0180668 (2017).
 85. A. M. Shibeko, B. Chopard, A. G. Hoekstra, and M. A. Pantelev, *Biophys. J.*, **119** (3), 638 (2020).
 86. G. L. Dale, P. Friese, P. Batar, et al., *Nature*, **415** (6868), 175 (2002).
 87. M. A. Pantelev, N. M. Ananyeva, N. J. Greco, et al., *J. Thromb. Haemost.*, **3** (11), 2545 (2005).
 88. A. N. Sveshnikova, F. I. Ataulakhanov, and M. A. Pantelev, *Mol. Biosyst.*, **11** (4), 1052 (2015).
 89. Y. N. Kotova, F. I. Ataulakhanov, and M. A. Pantelev, *J. Thromb. Haemost.*, **6** (9), 1603 (2008).
 90. T. A. Kovalenko, M. A. Pantelev, and A. N. Sveshnikova, *J. Theor. Biol.*, **435**, 125 (2017).
 91. Y. N. Kotova, N. A. Podoplelova, S. I. Obydenyy, et al., *Thromb. Haemost.*, **119** (6), 906 (2019).
 92. N. A. Podoplelova, A. N. Sveshnikova, Y. N. Kotova, et al., *Blood*, **128** (13), 1745 (2016).
 93. A. A. Abaeva, M. Canault, Y. N. Kotova, et al., *J. Biol. Chem.*, **288** (41), 29621 (2013).
 94. N. R. Hill, S. T. Fatoba, J. L. Oke, and J. A. Hirst, *PLoS One*, **11** (7), e0158765 (2016).
 95. N. N. Topalov, Y. N. Kotova, S. A. Vasil'ev, and M. A. Pantelev, *Br. J. Haematol.*, **157** (1), 105 (2012).
 96. S. I. Obydenyy, A. N. Sveshnikova, F. I. Ataulakhanov, and M. A. Pantelev, *J. Thromb. Haemost.*, **14** (9), 1867 (2016).
 97. S. S. Shakhidzhanov, V. I. Shaturny, M. A. Pantelev, and A. N. Sveshnikova, *Biochim. Biophys. Acta*, **1850** (12), 2518 (2015).
 98. A. N. Sveshnikova, A. V. Balatskiy, A. S. Demianova, et al., *J. Thromb. Haemost.*, **14** (10), 2045 (2016).
 99. J. L. Dunster, M. A. Pantelev, J. M. Gibbins, and A. N. Sveshnikova, *Methods Mol. Biol.*, **1812**, 255 (2018).

100. S. I. Obydenyi, E. O. Artemenko, A. N. Sveshnikova, et al., *Haematologica*, **105** (4), 1095 (2020).
101. A. Martyanov, D. S. Morozova, M. A. Sorokina, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (9) 3035 (2020).
102. A. Martyanov, F. A. Balabin, J. L. Dunster, et al., *Biophys. J.*, **118** (11), 2641 (2020).
103. A. Martyanov, A. E. Boldova, M. G. Stepanyan, et al., *Thromb. Res.*, 211, 27 (2022).
104. O. Yakimenko, F. Y. Verholomova, Y. N. Kotova, et al., *Biophys. J.*, **102** (10), 2261 (2012).
105. D. Y. Nechipurenko, A. M. Shibeko, A. N. Sveshnikova, and M. A. Panteleev, *Hamostaseologie*, **40** (4), 524 (2020).
106. A. Tosenberger, F.I. Ataulakhanov, N. Bessonov, et al., *J. Theor. Biol.*, **337**, 30 (2013).
107. V. Belyaev, M. A. Panteleev, and F. I. Ataulakhanov, *Biophys. J.*, **109** (2), 450 (2015).
108. T. J. Stalker, E. A. Traxler, J. Wu, et al., *Blood*, **121** (10), 1875 (2013).
109. V. N. Kaneva, J. L. Dunster, V. Volpert, et al., *Biophys. J.*, **120** (2), 334 (2021).
110. P. V. Trifanov, V. N. Kaneva, S. V. Strijhak, et al., *Supercomput. Front. Innovations*, **5** (4), 67 (2018).
111. A. Masalceva, V. N. Kaneva, M. A. Panteleev, et al., *J. Biomechanics*, **130**, 110801 (2022).

Mechanisms Involved in Regulation of Blood Coagulation: History of Research and Perspectives

D.Y. Nechipurenko*, **, ***, **M.A. Panteleev***, **, ***, ****, **E.I. Sinauridze****, ***,
K.S. Troyanova*, **, **A.D. Megalinsky****, **N.A. Podoplelova****, ***,
A.M. Shibeko**, ***, **A.N. Balandina****, ***,
E.V. Koltsova**, ***, **and F.I. Ataulakhanov***, **, ***, ****

**Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia*

***Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences,
Srednyaya Kalitnikovskaya ul. 30, Moscow, 109029 Russia*

****National Medical Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev,
ul. Samory Mashela 1, Moscow, 117997 Russia*

*****Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per. 9, Moscow, 115184 Russia*

Blood clotting is the most important physiological response in the body to disruption to vascular structure or vessel wall abnormalities. This process is non-stationary, involving many not fully established mechanisms of spatial regulation, and an understanding of this process is essential for the prevention of a large number of life-threatening conditions. This review is focused on investigations into the research of blood clotting processes by a team of biophysicists, alumni and employees of the Biophysics Department of the Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, who created one of the leading Russian scientific schools for experimental and theoretical approaches to the study of the hemostasis system. The review describes the main directions of research, which included many diverse aspects of the problem - from the development of theoretical models of blood coagulation to the development and clinical studies of new methods for assessing the state of the hemostasis system.

Keywords: hemostasis, blood coagulation, fibrin, thrombin, platelets